UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR L'ACTION TRANSFÉRANTE DE QUELQUES OSIDASES AGISSANT SUR LES OLIGOSACCHARIDES NON RÉDUCTEURS

THÈSE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Pharmacie)

Présentée par **Mohammad-Ali KOLAHI-ZANOUZI**

Pharmacien de l'Université de Tabriz

Soutenue le *1962, devant la Commission d'examen*

JURY { MM. J.E. COURTOIS, Président
P. MALANGEAU, Professeur
F. PERCHERON, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI^e^
1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538128_0016

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR L'ACTION TRANSFÉRANTE DE QUELQUES OSIDASES AGISSANT SUR LES OLIGOSACCHARIDES NON RÉDUCTEURS

THÈSE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Pharmacie)

Présentée par **Mohammad-Ali KOLAHI-ZANOUZI**

Pharmacien de l'Université de Tabriz

Soutenue le *1962, devant la Commission d'examen*

JURY { MM. J.E. COURTOIS, Président
P. MALANGEAU, Professeur
F. PERCHERON, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI^e^
1962

RIJKS UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE	Doyen
	M.M. JANOT	Assesseur
	G. CUVIER	Secrétaire Général
	L. JEANDEL	Secrétaire Général-Adjoint
Mme	S. CERTAIN	Secrétaire
Mme	M.L. ESPINASSE	Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M.	René FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	René FABRE	Membre de l'Institut
	DELEPINE	Membre de l'Institut
	LAUNOY	
	FLEURY	
	MASCRE	
	PICON	
	BEDEL	

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
	M. GUILLOT	Physique (T)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T)
Mlle	S. LAMBIN	Microbiologie (T)
MM.	Y. RAOUL	Zoologie appliquée (T)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
	L. ROMANGE	Chimie minérale (T)
	P. CRETE	Botanique (T)

MM.	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	A. MORETTE	Hydrologie (T)
	R. CAVIER	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
	A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON	Professeur sans chaire
	J. FLAHAUT	Professeur sans chaire
	C. BOUDENE	Professeur sans chaire
	A. Le HIR	Professeur sans chaire
	J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	P. LARUELLE	Physique
	G. Le MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	G. PAOLETTI	Radio-isotopes Applications à la Biologie et à la pharmacie
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Biologie végétale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (section biologie)
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	Microbiologie
MM.	R. LELUC	Microbiologie
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
MM.	P. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. PERLES(F.Fonc.)	Chimie biologique
	J. PESTIS	Biologie animale
	P. POULLAIN	Hématologie
	J. RIVET (F.Fonc.)	Physique
Mme	M. ROBERT	Sérologie
Mlles	A. ROLLEN	Biologie végétale
	L. SEGUIN(F.Fonc.)	Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (section Physico-chimique)
Mme	H. SELLER(F.Fonc.)	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER(F.Fonc.)	Chimie analytique (1ère année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVE	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle	H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M.	ROBBA	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Mlle	Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Mlle	LAVAUD	Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	Bibliothécaire
	KREHMER	Bibliothécaire

—

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous a constamment dirigé au cours de nos recherches.

En témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY,

Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien honoraire des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur,

Hommage de profond respect.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Hommage de vive et respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur P. PERCHERON,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Qui a bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

Hommage respectueux.

A la mémoire de mon Père,

A ma Mère,

En témoignage de mon affectueuse reconnaissance et de mon attachement filial.

A ma Femme et à mon Fils,

A mes Frères et Sœurs,

A ma Famille ,

A mes Amis.

RECHERCHES SUR L'ACTION TRANSFERANTE DE QUELQUES OSIDASES AGISSANT SUR LES OLIGOSACCHARIDES NON REDUCTEURS

-:-

INTRODUCTION

-:-

C'est en 1935 que RABATE découvrit l'action transférante de la β-glucosidase.

La possibilité de transférer un osyl d'un donateur sur un accepteur hydroxylé fut, par la suite, decelée dans la plupart des hydrolases conventionnelles agissant sur les oligosaccharides et hétérosides ; c'est ainsi que l'invertine, l'émulsine ont une action transférante.

Les recherches sur les transferts d'oses ou transosylations ont fait l'objet de plus d'un millier de publications.

Ces réactions peuvent être representees par le schéma suivant HEHRE (66)

$$\text{Glycosyl- X} + \text{H - X'} \rightleftharpoons \text{Glycosyl- X'} + \text{H - X}$$

X' peut être OH, dès lors il y a hydrolyse de l'oside : Glycosyl - X, en un ose et un dérivé hydroxylé : alcool ou phénol.

L'hydrolyse par les glucidases est donc un cas particulier du phénomène général des transosylations ; les anciennes hydrolases des glucides sont des transosylases intervenant avec l'eau comme accep~~donat~~teur. Il n'en demeure pas moins au point de vue pratique que ces réactions d'hydrolyse occupent encore une place prépondérante en biochimie. En effet, les réactions enzymatiques des glucidases ont lieu en milieu aqueux. Une augmentation de la concentration en donateur et en accepteur diminue certes la proportion d'eau dans le milieu réactionnel, mais l'enzyme est une protéine dont ces

augmentations de concentration favorisent la dénaturation.

Certains corps sont des donateurs ou des accepteurs assez spécifiques et interviennent même en milieu dilué.

Le saccharose est le plus important de ces corps. C'est un excellent donateur soit du groupement β -fructofuranosyl transférable par les transfructosidases, soit du groupement α -glucopyranosyl transférable par les α -glucosidases.

Le saccharose est par ailleurs un excellent accepteur et à de faibles concentrations il conduit à des trisaccharides : fructosido-saccharoses isomères avec les transfructosidases, raffinose et plantéose avec les trans α -galactosidases, etc..

Les réactions de transfructosylation ont fait l'objet de nombreux travaux décrits dans les revues générales de BACON (13) DEDONDER (49), EDELMAN (53).

Divers di- et trisaccharides nouveaux ont été obtenus par transfert de fructose.

Nous nous sommes proposé de compléter ces recherches en étudiant les possibilités de transfert sur les galactosides du saccharose.

Les galactosides du saccharose de la série raffinose - stachyose - verbascose sont largement répandus dans les végétaux COURTOIS (25) (26) (27), ils sont souvent tres abondants dans les organes de réserve : racines et surtout graines. Dans ces organes, le saccharose coexiste avec ses galactosides.

Nous nous sommes proposé de rechercher si l'on pouvait déceler des transferts de fructose sur les galactosides du saccharose : raffinose et stachyose.

De tels transferts purent être vérifiés, ce qui nous amena à entreprendre l'isolement des oligosaccharides synthétisés afin d'en préciser la structure.

Ces opérations se révélèrent particulièrement longues et dif-

ficiles, elles permirent cependant de séparer de petites quantités d'oligosaccharides qui paraissent ne pas encore avoir été décrits. Ces recherches, qui s'étendirent tout au long de notre séjour au laboratoire, ne figurent que dans la dernière partie de cette thèse.

La première partie de ce travail contiendra l'exposé des expériences que nous avons effectuées parallèlement aux opérations d'isolement, qui nous laissaient de longs intervalles libres.

Le but initial de ces essais fut l'étude de l'action des enzymes sur un disaccharide non réducteur : le tréhalose.

Les deux principaux disaccharides naturels non réducteurs sont le saccharose et le tréhalose. Il est connu depuis les travaux de BOURQUELOT et de ses élèves que le saccharose est présent dans tous les végétaux chlorophylliens, c'est le principal produit glucidique élaboré au terme des processus physico-chimiques et biochimiques de la photosynthèse.

Le tréhalose est le composé naturel le plus proche du saccharose. Dans le saccharose une molécule de glucose est unie par son groupe réducteur à la fonction cétonique du fructose pour former un α-D-glucopyranosyl (1 $\rightleftarrows$ 2) β-D-fructofuranoside.

Dans le tréhalose, ce sont deux molécules d' α-glucose qui sont liées par leurs groupes réducteurs pour former un α-D-glucopyranosyl (1 $\rightleftarrows$ 1) α-D-glucopyranoside.

Le tréhalose fut longtemps considéré comme un parent pauvre de son cousin le saccharose. Il est maintenant prouvé que le tréhalose est présent dans un bien plus grand nombre d'espèces que le saccharose. En effet, le tréhalose se rencontre dans de très nombreux champignons, mais depuis dix ans il a été montré que c'est le principal glucide du sang des insectes. Il est très probablement présent dans la plupart, sinon la totalité, des 700.000 espèces d'insectes recensées ; ce chiffre imposant ne le cède donc pas à celui des végétaux chlorophylliens à saccharose.

Le tréhalose est hydrolysé en deux molécules de glucose par un enzyme tout à fait spécifique : la tréhalase. Cette tréhalase est fort répandue : champignons, végétaux, insectes, poissons, mammifères.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier la tréhalase parallèlement à la fructosidase agissant sur le saccharose.

DAHLQVIST (42) a obtenu récemment une tréhalase purifiée à partir de la muqueuse intestinale du Porc. Il a pu constater que cet enzyme était dépourvu d'action transférante. Nous avons orienté nos recherches dans cette direction et nous avons constaté que trois tréhalases d'origines très diverses, celles de levure, de Hanneton et de graines de Plantago étaient également dépourvues d'action transférante.

Ainsi les enzymes agissant sur les deux disaccharides non réducteurs naturels les plus abondants se différencient nettement. La fructosidase a une action transférante importante et variée, la tréhalase paraît dépourvue de toute action transférante.

Au cours de ces essais avec les tréhalases nous avons été amené à déterminer certains caractères de ces enzymes et à purifier la tréhalase du Hanneton.

Le Hanneton possède en effet une activité tréhalasique élevée, ce qui nous a incité à comparer la tréhalase aux autres glucidases de cet insecte. Nous avons pu déceler des glucidases fort variées dans le Hanneton ; ce qui nous a permis de comparer l'équipement enzymatique du Hanneton avec ceux d'insectes xylophages étudiés en même temps par d'autres chercheurs du laboratoire de Chimie Biologique.

Ce sont ces recherches sur la tréhalase qui figureront dans la première partie, celles sur la fructosidase y faisant suite.

Nos recherches ont ainsi évolué en s'adaptant aux faits trouvés. L'action transférante marquée de la fructosidase et l'absence d'une activité transosylante de la tréhalase sont la cause du

caractère assez différent que présentent les deux parties de notre thèse. Les résultats expérimentaux nous ont conduit et dirigé en fonction de ces divergences d'action, leur ensemble demeurant une contribution à l'étude de ce problème biochimique passionnant que représentent les réactions de transosylations.

Avant de passer à l'exposé de nos resultats, nous désirons tout d'abord remercier ceux qui nous ont dirigé au milieu des difficultés de ce travail.

Notre reconnaissance va en premier lieu à notre Maître, Monsieur le Professeur COURTOIS, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous a constamment guidé dans nos recherches, nous faisant profiter de sa précieuse experience et nous prodiguant ses conseils éclairés. Il nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueux attachement.

Nous désirons exprimer nos sincères remerciements à Monsieur le Professeur FLEURY, qui a toujours porté un bienveillant intérêt à nos recherches.

Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur MALANGEAU et à Monsieur le Professeur PERCHERON qui ont accepté de faire partie de notre jury.

Nous tenons à remercier nos camarades du laboratoire pour leur aide constante et très spécialement Monsieur F. PETEK, Attaché de recherches au C.N.R.S., qui nous a constamment aidé à réaliser ce travail. Nous exprimons tous nos remerciements à Madame A. de GRANDCHAMP, Docteur ès Sciences, à Monsieur TO-DONG, Attaché de Recherches au C.N.R.S., et à Monsieur P. le DIZET, Ingénieur agricole, qui nous ont aidé dans la rédaction de cette thèse.

PREMIERE PARTIE

-:-

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LA TREHALASE

-:-

Le tréhalose et les tréhalases ont eté l'objet d'une revue de MYRBÄCK en 1949 (87).

En 1950, GOTTSCHALK (63) a publié une mise au point des recherches sur les tréhalases que LARNER (82) en 1960 définit comme des α-1,1-glucosidases.

Iº- Historique

Le sucre connu sous le nom de tréhalose a été découvert en 1832 par WIGGERS dans l'ergot de seigle (Claviceps purpurea) (109).

BERTHELOT en 1859 a obtenu la même substance dans la manne de tréhala de Perse (cocons d'un insecte parasite "Larinus nidificaris") et l'a dénommée tréhalose (16).

Le tréhalose a été rencontré ensuite dans un grand nombre de champignons où il semble jouer un rôle analogue au saccharose dans les végétaux supérieurs IWANOFF (74).

L'hémolymphe d'un certain nombre d'insectes renferme le tréhalose comme principal élément glucidique WYATT et KALF (111) (112). Il est généralement admis que le tréhalose existe dans le sang des larves, mais HELLER a signalé une exception chez Celerio euphorbia où le tréhalose apparaissant au stade de chrysalide atteint rapidement une concentration maximum qui se maintient jusqu'à la forme adulte et s'abaisse ensuite (70). Cette chute de concentration en tréhalose a été également observée par DUCHATEAU et FLORKIN (51).

La découverte de la tréhalase a été faite par BOURQUELOT en 1893 en étudiant l'hydrolyse du tréhalose par une préparation d'Aspergillus niger. Il a différencié la tréhalase de la maltase par l'étude de la stabilité à la chaleur : la tréhalase est complètement détruite à 63°C, tandis que la maltase reste encore active à cette température et n'est détruite qu'à 75°C. C'est la première preuve que la tréhalase est un enzyme distinct de la maltase (18) (19).

2°- Répartition

Tableau n°1

Répartition des tréhalases dans les plantes

Organismes	Références
Cryptogames	
Lycogala	IWANOFF (74)
Mucor	SATINA, BLAKESLEE (97)
Saccharomyces	FISCHER (56), KALANTHAR (76), LINDNER (84)
Aspergillus niger	BOURQUELOT (18)(19)
Penicillium glaucum	BOURQUELOT (18)(19)
Monilia candida	LINDNER (84)
Cèpe comestible Boletus eludis	BOURQUELOT, HERISSEY (20) (21)
Bolet ou cèpe roux Boletus auranticus	
Bolet jaune B. luteus	
Cèpe bai B. badius	
Amanite tue-mouches Amanita muscaria	
Amanite vineuse A. rubescens	
Lactaire couleur de plomb Lactarius turpis	
Lactaire toisonné L. torminosus	
Paxille enroulé Paxillus involutus	
Russule sans lait Russula delica	
Cortinaire élevé Cortinarius elatior	
Volvaire gluante Volvaria speciosa	BOURQUELOT (18)(19)
Phanérogames	
Orge germé Hordeum sativum	FISCHER (56)
Amandes douces Amygdalus communis	WEIDENHAGEN (105)

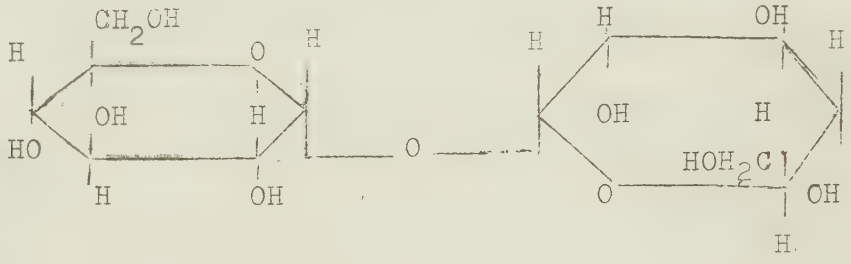
Tableau n°II

Répartition des tréhalases dans les animaux

Organismes	Références
Insectes	
Bourdons, Blaps, Timarcha, Coccinelles, Courtilières, Doryphores, Mouches, Vers à soie	FREREJACQUE (61)
Fourmi royale Phormia regina	FRIEDMAN (60)
Sauterelle Schistocerca gregaria	HOWDEN, KILBY (72)
Ver à soie Bombyx mori	SAITO (96)
Fausse teigne des ruches Galleria mellonella	KALF, RIEDER (78)
Blatte Leucophaea maderae	ZEBE, McSHAN (113)
Crustacés	
Cloportes : Porcello laevis ; Oniscus asellus	FREREJACQUE (61)
Homard Homarus vulgaris	WILLSTADT, BORGGARD (110)
Poissons	
Perche fluviatile Perca fluviatilis (sérum sanguin) Brochet Esox lutius (sérum sanguin) Carpe Cypninus carpio (sérum sanguin) Raniceps raninus (sérum sanguin et muqueuse intestinale) Vieille Labrus berggylta (sérum sanguin et muqueuse intestinale) Plie Pleuronectes platessa (muqueuse intestinale)	FISCHER, NIEBEL (57)
Cottus scorpius (muqueuse intestinale)	WILLSTADT, BORGGARD (110)
Mammifères	
Cheval (muqueuse de l'intestin grêle)	
Boeuf (muqueuse de l'intestin grêle)	FISCHER, NIEBEL (57)
Porc (muqueuse intestinale)	DAHLQVIST (42)

3°- Spécificité et propriétés

La tréhalase hydrolyse la liaison osidique du tréhalose qui est un α-D-glucopyranosyl (1→←1)-α D-glucopyranoside.



Trehalose

La maltase de levure n'agit pas sur le tréhalose, et il n'y a pas de doute que la tréhalase soit un enzyme distinct de celle-ci.

Les travaux de HELFERICH et de BABA ont montré que le 6-méthane-sulfonyl-tréhalose et l'ester monophosphorique en 6 du tréhalose sont des substrats pour la tréhalase (69) (8). Ceci explique que l'enzyme soit capable d'hydrolyser le tréhalose substitué sur l'une de ses deux fonctions alcool primaire.

Toutefois, FRIEDMAN a constaté que l'enzyme purifié des fourmis était dépourvu d'action sur le tréhalose-phosphate ; cet ester est attaqué par une phosphatase spécifique qui l'hydrolyse en acide phosphorique et tréhalose. Le tréhalose ainsi formé est alors hydrolysé par la tréhalase (60). Le même résultat a été obtenu par CANDY et KILBY avec l'enzyme de la sauterelle Schistocerca gregaria: l'hydrolyse du tréhalose-phosphate est causée par une tréhalose-phosphate phosphatase spécifique, distincte de la tréhalase (23).

La trehalase semble avoir une affinité très grande pour l'α-α-tréhalose. Les D-glucosides suivants ne sont pas hydrolysés par l'enzyme : les méthyl-glucosides α et β , les phényl-glucosides α et β , le saccharose, le maltose, le cellobiose, l'amidon et le glycogène.

Les tréhalases des mycobactéries et d'E. Coli K 12 sont inhibées par la tréhalosamine GHIONE, MINGHETTI et SANFILIPPO (62). L'enzyme de Phormia regina est inhibé par la trihydroxyéthanolamine FRIEDMAN (60).

Des recherches intéressantes sur la tréhalase intestinale du Porc ont été faites par DAHLQVIST.

D'après cet auteur, cette tréhalase est un enzyme spécifique, ne possédant pas d'activités invertasique, maltasique et isomaltasique. La préparation enzymatique n'hydrolyse pas le β - β tréhalose, alors qu'elle attaque lentement l'α - β -tréhalose. Des essais d'inactivation par la chaleur ont conduit l'auteur à penser que l'α - β -tréhalose doit être scindé par un enzyme distinct de l'α - α -tréhalase.

La tréhalase ne possède pas d'activité transférante et n'est pas susceptible de synthétiser le tréhalose. Par contre, l'invertase et la maltase sont des enzymes transférants. Il est donc probable que l'enzyme attaque le tréhalose d'une manière plus symétrique que d'autres osidases (42).

La tréhalase, comme la lactase et la cellobiase est localisée dans le duodénum et dans le jéjunum de l'intestin grêle. Par contre, l'invertase, la maltase et l'isomaltase sont décelées dans la partie distale, ce qui indique que les différents disaccharides seraient absorbés à des endroits différents de l'intestin grêle (45).

Par chromatographie sur TEAE-cellulose, DAHLQVIST a séparé trois maltases distinctes, dont aucune n'agit sur le tréhalose (40).

L'influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale de l'hydrolyse de différents osides par les osidases intestinales a été étudiée par DAHLQVIST. Contrairement aux autres osidases, la tréhalase n'est pas inhibée, même à de fortes concentrations en tréhalose (jusqu'à 30 p.100) (44).

CHAPITRE II
MATERIEL ET TECHNIQUES

-:-

A) Préparation des substrats

Les oses et osides utilisés sont des échantillons commerciaux du laboratoire ou des produits préparés par nos soins.

Iº- PREPARATION DE L'α-D-PHENYLGALACTOSIDE :

Nous avons employé la technique de HELFERICH et SCHMITZ-HILLEBRECHT (68).

Ce corps est obtenu par désacétylation de l'α-D-tétracétyl-phényl-galactoside, préparé lui-même par action du phénol sur le pentacétyl-β-D-galactose, en présence de chlorure de zinc.

1) Préparation du pentacétyl-β-D-galactose

50 g de galactose, 24 g d'acétate de sodium fondu et 250 ml d'anhydride acétique sont chauffés lentement dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux jusqu'à dissolution complète du galactose.

Après refroidissement jusqu'à 60° environ, le contenu du ballon est versé dans 10 litres d'eau glacée.

Il se forme un précipité blanc, qui, après quelques heures de repos, est recueilli par filtration sur Büchner. Après trois ou quatre lavages à l'eau, le pentacétyl-β-D-galactose est purifié par recristallisation dans l'alcool méthylique absolu.

Le produit est séché ensuite sur une plaque poreuse à la température du laboratoire. Il a un point de fusion de + 147° au bloc Maquenne.

2) Préparation de l'α-D-tétracétylphénylgalactoside

60 g de pentacétyl-β-D-galactose sont mélangés avec 60 g de phénol, 40 ml d'acide acétique glacial, 10 ml d'anhydrique acétique, 15 g de chlorure de zinc fondu. Le ballon dans lequel s'effectue la réaction est plongé dans un bain d'huile et relié par l'intermédiaire d'un réfrigérant à une trompe à vide. La réaction se poursuit pendant 2 heures à 120-125°. Le contenu du ballon est épuisé ensuite deux ou trois fois par du benzène, les solutions benzéniques sont lavées d'abord par la soude 2 N jusqu'à ce que la solution sodique reste incolore, puis par l'eau distillée, les solutions sont ensuite filtrées et évaporées.

Le résidu d'évaporation est repris par l'éthanol à 95°, l'α-D-tétracétylphényl-galactoside cristallise par refroidissement.

Le produit obtenu a un point de fusion compris entre 124° et 126° au bloc Maquenne.

3) Désacétylation de l'α-D-tétracétylphényl-galactoside

3°- 10 g d'α-D-phényltétracétyl-galactoside sont dissous dans 50 ml de méthanol absolu contenant 0,01 g de sodium. Après ébullition de 2 heures au bain-marie, la solution est évaporée à sec.

Le résidu d'évaporation est dissous dans une petite quantité d'eau. Le phényl-galactoside cristallisé est purifié par recristallisations successives.

Nous avons obtenu un produit qui a les caractéristiques suivantes :

- point de fusion au bloc Maquenne = 141°
- pouvoir rotatoire $(\alpha)_D$ = + 215° (dans $CHCl_3$)
- $(\alpha)_D = \frac{1,09 \times 100}{2 \times 0,253} = + 215°$
- A = 1°,09 $\quad \ell = 2 \quad$ c = 0,253

2°- PREPARATION DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE

Ce corps a été préparé selon la méthode de HELFERICH (67).

100 g de pentacétyl-β-galactose sont mélangés avec 100 g de phénol et 0,2 g d'acide p.toluène-sulfonique. Le ballon dans lequel s'effectue la réaction est plongé dans un bain d'huile et relié par l'intermédiaire d'un réfrigérant à une trompe à vide.

La réaction se poursuit pendant 2 h à 110°-115° sous une pression de 70-80 mm Hg. Après refroidissement, le contenu du ballon est extrait à chaud deux ou trois fois par 250 ml de benzène. Les solutions benzéniques sont lavées d'abord par l'eau distillée puis par la soude N jusqu'à ce que la solution sodique reste incolore, enfin deux fois par l'eau distillée : les solutions sont ensuite déshydratées par $C\ell_2Ca$, filtrées puis évaporées. Le résidu d'évaporation est repris par 100 ml de $CC\ell_4$. Le phényl-tétra-acétyl β-D-galactopyranoside cristallise par refroidissement.

Après désacétylation de ce produit, nous obtenons le phényl-β-D-galactoside, de constantes physiques suivantes :

PF = + 155°

$(\alpha)_D$ = - 43° (dans l'eau)

A = - 0°,333 $\quad \ell = 1 \quad$ c = 0,774

3°- PHENYL-GLUCOSIDES α ET β, PHENYL-MANNOSIDES α ET β

Ces hétérosides du phénol nous ont été obligeamment fournis par MM. PETEK et TO DONG, à qui nous adressons nos remerciements. Les composés ont été préparés suivant la réaction de Helferich, qui consiste en une condensation de l'hexose acétylé avec le phénol en présence d'un catalyseur approprié, suivie d'une désacétylation (68).

4°- PREPARATION DU STACHYOSE

Nous avons employé la méthode utilisée habituellement dans notre laboratoire.

500 g de crosnes du Japon [Stachys tuberifera L. (Labiacées)] traités par 1 l d'alcool à 70° préalablement additionné de 4 g de carbonate de calcium sont portés à l'ébullition pendant 1 heure sous réfrigérant à reflux. Nous décantons le liquide surnageant et y ajoutons celui obtenu par pression. Nous filtrons, puis concentrons sous pression réduite à 50° jusqu'à un volume de 250 ml, nous déféquons le liquide obtenu par l'acétate basique de plomb (environ 7 p.100). Nous filtrons, éliminons l'excès de plomb par l'acide sulfurique à 20 p.100 et neutralisons par le carbonate de calcium.

Le filtrat obtenu est concentré sous vide jusqu'à 100 ml et trituré avec de la baryte hydratée, nous ajoutons la quantité correspondant à la totalité de l'extrait sec de la solution. Après centrifugation, le liquide surnageant est additionné de trois volumes d'éthanol à 95°. Après repos de 24 heures, le précipité barytique recueilli sur Büchner est mis en suspension dans l'eau distillée et décomposé par l'acide sulfurique à 20 p.100 jusqu'à réaction franchement acide à la phénolphtaléine ; nous neutralisons rapidement par addition de carbonate de calcium en excès, portons à l'ébullition quelques minutes et éliminons la fraction insoluble par centrifugation. Nous concentrons sous pression réduite à 50° jusqu'à obtention d'un sirop épais. Celui-ci est repris par 200 ml d'éthanol à 90° en chauffant 1/4 d'heure au bain-marie dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. Nous laissons reposer 24 heures à la température du laboratoire, décantons l'alcool surnageant et amorçons avec un cristal de stachyose. La durée de la cristallisation complète de chaque reprise est de 3 semaines.

Nous avons obtenu un produit homogène à la chromatographie, cristallisant avec 5 molécules d'eau, de pouvoir rotatoire égal à

$$(\alpha)_D^{21°} = + 148° \text{ (dans l'eau)}$$

$$A = + 4°,44 \qquad \ell = 2 \qquad c = 1,5$$

5°- PREPARATION DU TREHALOSE

Nous avons utilisé, en la modifiant légèrement, la méthode de TANRET employant la levure haute de panification (102).

1 kg de levure fraîche Springer, finement délité est étalé en couche mince sur une feuille de papier filtre et séché pendant 24 heures sous vide phosphorique.

La dessiccation terminée, nous obtenons 300 g de levure sèche, que nous broyons finement au mortier et introduisons dans un ballon de 3 litres muni d'un réfrigérant à reflux. Nous épuisons à 3 reprises par 1500 ml d'éthanol à 90° bouillant (5 fois le poids de levure sèche) pendant une heure. Apres centrifugation pour éliminer la levure, les alcools sont réunis et nous concentrons à 100 ml sous pression réduite sans dépasser 50°. Les graisses sont éliminées par agitation énergique avec 200 ml d'éther sulfurique dans une ampoule à décantation. Après avoir enlevé la couche éthérée, les traces d'éther restant dans la solution sont chassées par barbottage d'un courant d'air.

Nous traitons ensuite par l'acétate basique de plomb (environ 7 p.100). L'excès de plomb étant éliminé par l'acide sulfurique à 20 p.100, nous neutralisons l'acidité du milieu par le carbonate de strontium. Après une ébullition légère de la solution pendant 15 minutes, nous laissons refroidir et centrifugeons. Nous obtenons alors une liqueur limpide légèrement jaune dépourvue de pouvoir réducteur vis-à-vis du réactif cupro-alcalin de SOMOGYI (99). Cette liqueur est ensuite concentrée sous pression réduite à l'état de sirop épais que nous épuisons à plusieurs reprises pendant 15 minutes par 100 ml d'éthanol à 90° bouillant. Les solutions extractives laissent déposer lentement (15 jours) des cristaux de tréhalose.

Nous avons ainsi obtenu 2 g de tréhalose, homogène à la chromatographie sur papier, ayant en solution aqueuse un pouvoir rotatoire de + 179°,0

$A = 0°,93 \qquad \ell = 2 \qquad c = 0,260$

Rendement de l'opération 0,20 p.100 de la levure fraîche
0,66 p.100 " " " sèche

B) Dosage des sucres réducteurs

Parmi les nombreuses méthodes proposées pour le dosage des sucres réducteurs, nous avons choisi celle de SOMOGYI-NELSON. Cette méthode sensible, fidèle et simple, permet le dosage précis de 0 à 200 microgrammes de sucre.

La méthode de SOMOGYI (99) est basée sur la réduction du réactif cupro-alcalin par le sucre à doser. L'oxyde cuivreux formé est ensuite dosé par iodométrie. NELSON (88) a modifié cette méthode en remplaçant le dosage iodométrique par un dosage colorimétrique qui est plus sensible ; l'oxyde cuivreux forme un complexe coloré avec le réactif arséniato-molybdique indiqué par l'auteur.

a) Réactifs

Réactif de Somogyi :

Phosphate disodique		28 g
Sel de Seignette		40 g
Eau bidistillée	environ	350 g

Après dissolution ajouter tout en agitant :

NaOH N	100 ml
Solution de SO_4Cu à 10 p.100	80 ml
SO_4Na_2	180 g
Eau bidistillée q.s.p.	1000 ml

Laisser le réactif 48 heures à l'étuve à 37° et filtrer

Réactif Arséniato-molybdique de Nelson

Molybdate d'ammonium dissous dans 450 ml d'eau bidistillée	25 g
SO_4H_2 concentré	25 g
$AsO_4Na_2H, 7H_2O$ dissous dans 25 ml d'eau bidistillée	3 g

Laisser 48 heures à l'étuve à 37°.
- Le réactif obtenu doit être jaune clair et non vert. Cela nécessite l'emploi d'un arséniate pur qui doit donner dans l'eau une solution incolore.

Le réactif de Somogyi et celui de Nelson se conservent bien pendant quelques mois si on les garde en flacons bouchés à l'émeri à l'abri de la lumière.

b) Dosage

Dans une série de tubes jaugés de 20 ml, mesurer 2 ml de diverses concentrations de la solution sucrée, puis 2 ml du réactif de Somogyi dilué au 1/2 ; mélanger et boucher au coton cardé. Ensuite porter 20 minutes au bain-marie bouillant, refroidir rapidement et ajouter 1 ml du réactif de Nelson. Agiter et compléter à 20 ml avec de l'eau bidistillée. Après 20 minutes, on procède à une lecture au spectrophotomètre Jean et Constant à 6500 A°.

Pour les faibles concentrations en sucres, nous employons des tubes jaugés de 10 ml seulement, les différents temps de dosage étant les mêmes, seul le volume final est différent.

Les résultats obtenus par cette technique sont constants. Néanmoins, à chaque série, pour nous assurer de la bonne marche du dosage, nous refaisons trois points de la courbe du sucre étudié et nous rapportons nos résultats à cette droite témoin. On obtient ainsi d'excellents résultats à condition toutefois :

- d'utiliser une vaisselle rigoureusement propre (lavée au mélange sulfo-chromique)
- d'être très attentif à la limpidité des réactifs que l'on doit filtrer avant chaque dosage, en prenant soin d'employer des papiers filtres ne contenant pas de substances réductrices. Le papier Whatman n°1 nous a donné entière satisfaction.
- de respecter les conditions suivantes concernant le chauffage : le bain-marie ne doit pas cesser de bouillir au moment où

l'on introduit les tubes ; ceux-ci doivent être assez écartés pour que la temperature de 100° soit atteinte dans le minimum de temps.

Après 20 minutes, les tubes sont plongés dans l'eau froide.

- de maintenant la constance absolue de pH ; ceci oblige à neutraliser les hydrolysats acides après dilution (environ 1/10) dans un tampon phosphate M/15, pH 7,5 (PO_4KH_2 M/15 15,9 ml) qui ne gêne pas la réaction et favorise la neutralisation exacte de l'acide utilisé pour l'hydrolyse.

- que les solutions sucrées soient utilisées le plus tôt possible après leur préparation afin d'éviter les contaminations.

Avec cette méthode, comme avec toutes celles utilisées pour le dosage des sucres réducteurs, la pente de la courbe étalon varie avec chaque sucre. Au cours de nos essais, nous avons rapporté tous nos résultats à la droite donnée par les sucres étudiés : galactose, glucose, fructose et mannose.

C) Chromatographie sur papier

a) Papiers chromatographiques : nous avons utilisé les papiers Whatman n°1, n°3, n°4, Schleicher Schüll 2043 bM, qui diffèrent entre eux par leur porosité. Ce facteur joue un rôle considérable sur la vitesse d'écoulement du solvant, vitesse elle-même dépendante de la viscosité. La migration des glucides est la plus rapide avec le papier Whatman n°4. Les différentes catégories de papier nous permettent d'obtenir des taches bien délimitées, ce qui facilite l'interprétation des résultats.

b) Matériel utilisé : Les holosides de poids moléculaires relativement élevés migrent lentement par chromatographie sur papier et nous avons été obligé de pratiquer une chromatographie descendante au moyen d'un équipement totalement en verre.

L'enceinte en verre moulé très épais affecte la forme d'une cuve rectangulaire (fig.1) possédant les dimensions suivantes : hauteur 44 cm, largeur 34 cm , profondeur 17 cm. Les bords supérieurs

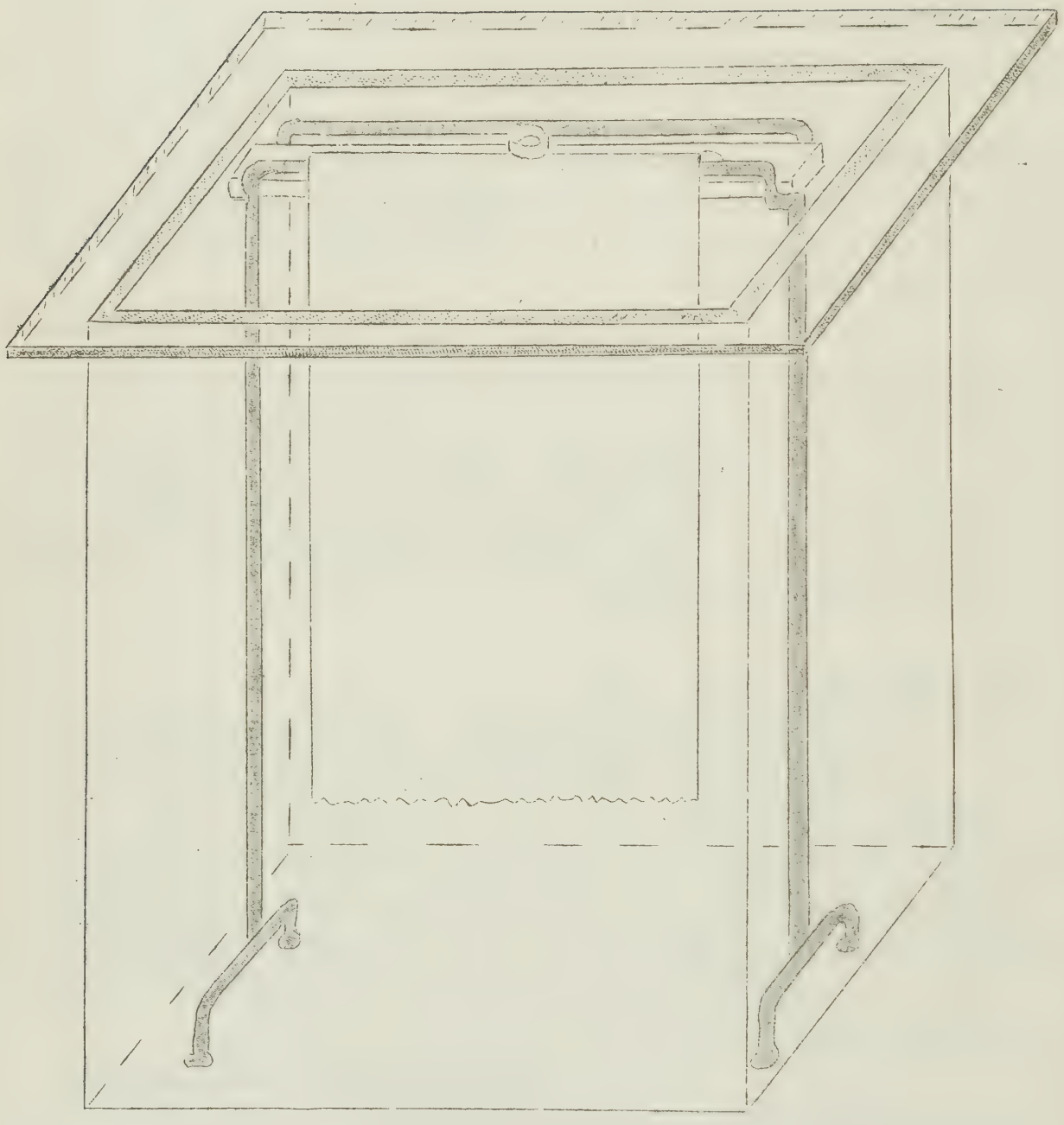


Fig. I : Cuve à chromatographie .

de la cuve sont aplanis à la meule, de façon à assurer une parfaite étanchéité de l'appareil fermé par une plaque de verre percée à son centre d'un trou de 1,4 cm de diamètre. Cet orifice est fermé par un bouchon de liège.

A l'intérieur de cette enceinte nous disposons, au moyen d'un support en verre, un auget affectant la forme d'une gouttière semi-cylindrique ; cet auget est destiné à contenir le solvant dans lequel baignera la partie supérieure du chromatogramme. Coupé à la longueur convenable et courbé à angles droits à ses deux extrémités, un gros agitateur repose au fond de l'auget et maintient le papier durant le développement ; une baguette de verre soudée au support écarte le papier des bords de l'auget afin d'éviter des effets de capillarité. Le support de verre reçoit l'auget de façon à utiliser la presque totalité de la hauteur de la cuve et situe celui-ci au-dessous du trou central de la plaque d'obturation supérieure.

c) Technique chromatographique

Nous découpons nos papiers en bandes rectangulaires de 40 cm de longueur et de 25 cm de largeur. Perpendiculairement aux côtés de la bande découpée et à 8 cm du côté supérieur de celle-ci, nous traçons au crayon les emplacements sur lesquels seront disposées les gouttes, les deux extrêmes à 3,5 cm des bords de la feuille et les cinq intermédiaires à 3 cm les uns des autres. Nous taillons en dents de scie de 1,5 cm de profondeur la partie inférieure de la feuille, cette dentelure régularise l'écoulement des solvants en diminuant les effets de bord susceptibles de modifier la direction des corps entraînés.

A l'aide de micropipettes préparées en étirant des tubes de verre de faible diamètre, nous déposons sur l'un des emplacements 3 ou 4 gouttes des divers milieux réactionnels. Ces micropipettes nous permettent de déposer des gouttes de diamètre voulu et nous nous sommes habitué à réaliser des gouttes de 5 mm de diamètre.

A l'emplacement extrême gauche de notre papier, nous déposons

une goutte de chacune des solutions à 2 p.100 des glucides employés comme corps de référence.

Quand nous déposons successivement plusieurs gouttes au même emplacement, nous avons soin de bien laisser sécher le papier entre deux affusions consécutives. Les dernières gouttes étant déposées, nous laissons également sécher le papier à la température du laboratoire.

Le papier qui a reçu les solutions à étudier est mis en place dans la cuve en prenant soin que la ligne de départ se situe au-delà de la baguette de verre sur laquelle s'appuie le papier et qu'elle soit horizontale.

Avant le développement, nous déposons dans le cristallisoir, au fond de la cuve, 100 ml du solvant monophasique employé pour le développement. Cette opération a pour but de saturer la cuve et d'imprégner le papier des vapeurs du solvant utilisé. L'enceinte est refermée par la plaque d'obturation. Après 12 à 18 heures de séjour, nous enlevons le bouchon de la plaque de verre et introduisons le solvant dans l'auget à l'aide d'un entonnoir. Nous refermons et laissons cheminer pendant le temps prévu.

La migration chromatographique des composés étudiés s'effectuant en présence de corps de référence, nous avons laissé le solvant s'écouler au bas de la feuille, selon le procédé indiqué par JERMYN et ISHERWOOD (75). Il nous est ainsi possible d'obtenir une séparation des holosides cheminant lentement en laissant s'écouler au delà du papier les glucides de mobilité plus grande.

Quand le développement est terminé, les chromatogrammes sont retirés délicatement de la cuve, séchés quelques minutes à l'air, puis à l'étuve à 100°, avant d'être soumis à l'action des révélateurs.

Ces expériences sont réalisées dans un local à température à peu près constante pendant la durée du développement.

d) Solvants utilisés

La chromatographie sur papier fut réalisée comparativement avec trois solvants monophasiques différents. Les solvants employés sont à marche lente et préparés par mélange de liquides organiques et d'eau, pour chacun d'eux, nous indiquons la composition en volumes.

I) n-Butanol, Pyridine, Eau (9 - 5 - 4). Ce solvant sépare très bien les hexoses et les disaccharides, en 24 heures, sans entraîner les acides uroniques associés.

II) Isopropanol, n-Butanol, Eau (7 - 1 - 2)

Le solvant II permet d'identifier les oligosaccharides supérieurs aux disaccharides après 48 à 72 heures de développement.

III) Acétate d'éthyle, Acide acétique, n-Butanol, Eau (3 - 2,5 - 4 - 4)

Ce mélange fait migrer oligosaccharides, oses et acides uroniques.

Pour les sucres methylés, nous avons employé les deux mélanges de solvants suivants :

IV) n-Butanol, Ethanol, Eau (50 - 10 - 40)

Ce mélange sépare presque tous les sucres méthylés, mais les Rg obtenus sont très rapprochés.

V) Benzène, Ethanol, Eau (170 - 60 - 15).

Ce solvant sépare bien le trimethyl-3-4-6-galactose des autres hexoses méthyles. De plus, il permet d'identifier les trimethyl-fructoses.

e) Réactions de révélation

Il existe de nombreuses réactions colorées susceptibles de révéler après chromatographie sur papier, les oses, les holosides et les polyholosides. Ces réactions sont basées sur certaines propriétés spécifiques des oses et des osides ; celles que nous avons utilisées mettent à profit soit leur aptitude à fournir des dérivés

furfuraliques se combinant aux amines et aux phénols pour donner des produits colorés, soit la rupture des liaisons α-glycol de ces composés par certains oxydants sélectifs comme l'acide périodique et le tétracétate de plomb.

Nous avons utilisé pour des essais préliminaires d'investigation, quatre réactifs susceptibles de nous fournir des indications générales sur le nombre des constituants d'un milieu réactionnel pouvant contenir à la fois alcools, oses, holosides et hétérosides.

1) Révélateur au tétracétate de plomb

Il est préparé en dissolvant quelques minutes avant l'emploi, le tétracétate de plomb dans l'éthanol pur. La révélation par ce réactif s'effectue déjà à la température du laboratoire, mais il est préférable de chauffer à 105° pendant deux ou trois minutes de manière à révéler les corps lentement oxydables. Avec ce révélateur, tous les corps à fonction α-glycol donnent des taches claires très nettes sur un fond de couleur jaune brunâtre.

Le tétracétate de plomb est préparé selon la technique suivante de DIMROTH et SCHWEITZER (50) :

750 ml d'acide acétique glacial sont additionnés de 20 ml d'anhydride acétique.

Le mélange est chauffé au voisinage de 60°. On y ajoute progressivement 200 g de minium pulvérisé préalablement desséché à l'étuve, chaque fraction de minium n'est ajoutée que lorsque la précédente a disparu totalement. La température s'élève jusqu'à 80° au cours de la réaction ; cette dernière est activée par un brassage continu assuré par une palette de verre montée sur un agitateur mécanique.

Lorsque le minium est complètement dissous, le mélange est refroidi dans la glace fondante.

Le tétracétate de plomb qui prend naissance sous forme de cristaux est recueilli par filtration, et lavé à l'acide acétique refroidi. Nous le purifions par recristallisation dans l'acide acé-

tique anhydre.

II) Révélateur à la β-naphtylamine

- Naphtylamine β : 0,10 g - Thymol : 1 g - acide orthophosphorique : 2 ml - éthanol à 80° q.s.p. 150 ml.

Nous obtenons des taches colorées par chauffage à 105° pendant cinq minutes. Les pentoses se colorent en rose, le fructose donne une teinte jaune clair très nette et les holosides renfermant du fructofuranose se colorent en jaune citron ; le glucose, le galactose et les holosides ne contenant que des aldohexoses dans leur molécule donnent des taches marron.

III) Révélateur à l'oxalate d'aniline

Ce révélateur est un mélange des deux solutions suivantes :
Solution A : n-Butanol : 80 ml, Ethanol : 50 ml, Aniline : 1 ml
Solution B : Acide oxalique : 2 g, Eau distillée : 40 ml

Les aldoses méthylés donnent des taches rouges sur fond blanc.

IV) Révélateur à l'oxalate d'urée

C'est une solution alcoolique saturée d'oxalate acide d'urée.

Les dérivés méthylés du fructose donnent des spots bleus sur fond blanc.

D) Technique de révélation

Sur le chromatogramme séché, nous appliquons le réactif approprié à l'aide d'un pulvérisateur de verre, ce petit appareil (fig.2) est actionné par une source d'air comprimé facilement réglable ; en appuyant plus ou moins fortement l'index sur l'ouverture du tube, nous réglons à la pression désirée et nous aspergeons uniformément le papier à révéler. Le chromatogramme est alors séché à l'étuve réglée à 105°, pendant le temps nécessaire à l'apparition des taches.

(Voir Fig.2 p. suivante)

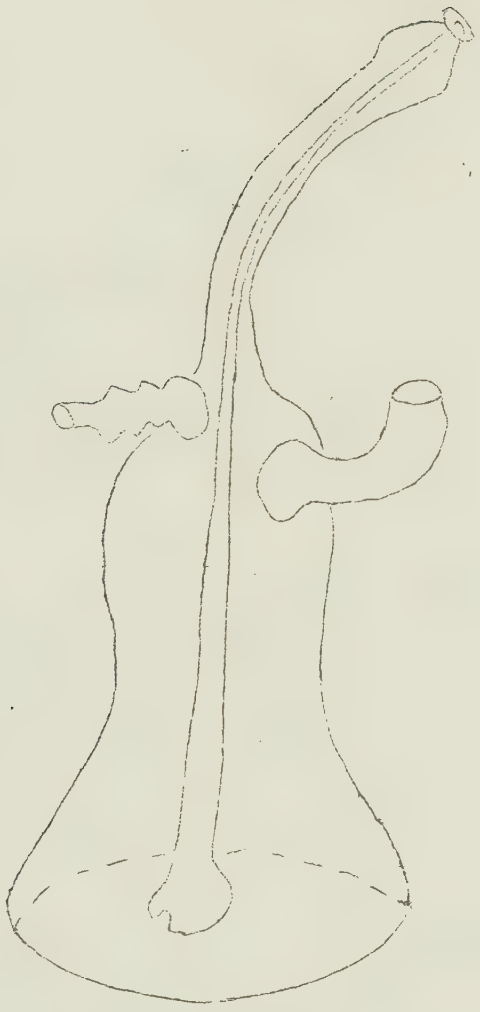


Fig. 2 : Pulvérisateur.

Le dépôt sur le papier de quantités sensiblement identiques de chacun des milieux réactionnels étudiés et un traitement analogue des chromatogrammes au développement et à la révélation nous ont permis de comparer la superficie et l'intensité des colorations des taches.

-:-

CHAPITRE III

ETUDE DES TREHALASES DE LEVURE ET DE GRAINES DE PLANTAIN

-:-

Nous nous sommes proposé d'étudier des tréhalases d'origines très différentes :

1) celle de levures hautes (Springer)

2) celle d'une graine (Plantago ovata.) Cette tréhalase a été décelée par COURTOIS, PETEK et TO DONG (35).

3) celle provenant d'un insecte (le Hanneton : Melolontha vulgaris.)

Nous avons déterminé les courbes de pH optimum d'activité et les constantes de Michaelis pour ces tréhalases. En outre, des essais de transfert sur les composés hydroxylés les plus variés ont été faits. Dans aucun cas nous n'obtenons d'activité transférante décelable. Nos résultats sur leur manque d'activité transférante confirment ceux déjà mentionnés par DAHLQVIST, à propos de la tréhalase intestinale de Porc (42).

Les résultats des recherches sur les tréhalases de levure et de graines de Plantain sont présentés dans ce chapitre. La tréhalase de Hanneton fera l'objet du chapitre IV.

A) ETUDE DE LA TREHALASE DES LEVURES

I°- Préparation de la tréhalase des levures :

50 g de levures hautes de Springer, 50 ml d'eau distillée et 20 ml de toluène sont mécaniquement agités 24 heures, puis abandonnés 7 jours à la température du laboratoire. Le milieu est ensuite mélangé avec 20 g de célite, et filtré sur Büchner jusqu'à obtention d'un liquide clair. Nous lavons le filtre avec 20 ml

d'eau distillée et réunissons les liquides. Nous dialysons la solution ainsi obtenue pendant 48 heures à la chambre froide contre de l'eau permutée, puis centrifugeons à 7000 t/min.

Le liquide surnageant constitue la préparation enzymatique telle que nous l'utiliserons au cours de nos recherches.

2°- Activité hydrolysante en fonction du pH

a) La gamme de pH choisie se situe entre 2,24 et 6,9. Cette gamme a été préparée avec un tampon acide citrique-phosphate disodique de Mc ILVAINE (73). Le pH varie selon les proportions respectives d'une solution 0,2 M de phosphate disodique et d'une solution 0,1 M d'acide citrique.

La concentration en ions phosphate dans l'essai est de 0,02M. Cette concentration est assez faible pour ne pas influencer l'activité hydrolysante de l'enzyme.

b) La concentration du substrat est de 0,01M. Nous avons toujours utilisé une solution-mère 0,025 M de tréhalose préparée extemporanément.

La concentration en enzyme est assez faible pour éviter la déprotéinisation au moment du dosage du glucose libéré.

Protocole opératoire

0,5 ml de tampon Mc Ilvaine de pH variant de 2,24 à 6,9, 0,5 ml de la préparation enzymatique, 2 ml d'une solution 0,025 M de tréhalose, 2 ml d'eau distillée. La réaction enzymatique est réalisée dans des tubes à hémolyse jaugés à 5 ml, les tubes sont portés dans un bain-marie réglé à 37°C. Après 3 heures de contact, ils sont immergés dans un bain d'eau glacée. En même temps nous avons fait 2 essais témoins, l'un avec l'enzyme sans addition de substrat, l'autre avec le substrat sans enzyme.

Nous procédons au dosage du glucose libéré par la méthode au réactif cupro-alcalin de NELSON-SOMOGYI (p. 17). Nous retranchons des valeurs obtenues pour les essais la somme des pouvoirs réducteurs provenant des témoins "substrats" et "enzymes" réalisés

dans les mêmes conditions opératoires.

Les activités sont calculées en μ Mol de tréhalose hydrolysé par minute et à 37° pour un litre de milieu réactionnel.

La courbe de pH optimum de la tréhalase de levures de Springer est présentée dans la fig.3

(Voir Fig.3 p.suivante)

Nous observons la présence de deux pH optima distincts, l'un à 4,1 et l'autre plus accentué à 5,4, ce qui peut laisser supposer l'existence de deux tréhalases associées, deux isoenzymes distincts.

3°- Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase de levure

Nous avons déterminé la constante de Michaelis au pH optimum le plus saillant. Le tampon utilisé est celui de Mc ILVAINE de pH 5,4 et de concentration 0,01 M en phosphate dans le milieu. Les concentrations en substrat pour cet essai sont respectivement 0,01 M, 0,005 M, 0,0025 M, 0,00125 M et 0,000625 M dans le milieu.

Les différentes concentrations sont obtenues par dilution à partir d'une solution-mère 0,025 M.

La quantité d'enzyme utilisée pour chaque essai est de 0,5 ml d'une préparation enzymatique diluée au sixième.

Protocole de l'essai

0,5 ml du tampon acide citrique-phosphate disodique de Mc ILVAINE de pH 5,4.

2 ml d'une solution de tréhalose $\frac{M}{40}$, $\frac{M}{80}$, $\frac{M}{160}$, $\frac{M}{320}$ ou $\frac{M}{640}$

0,5 ml d'enzyme

2 ml d'eau distillée.

Les dosages sont effectués après 1 heure d'incubation au bain-marie à 37°. Le calcul de la constante se fait selon la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK (85).

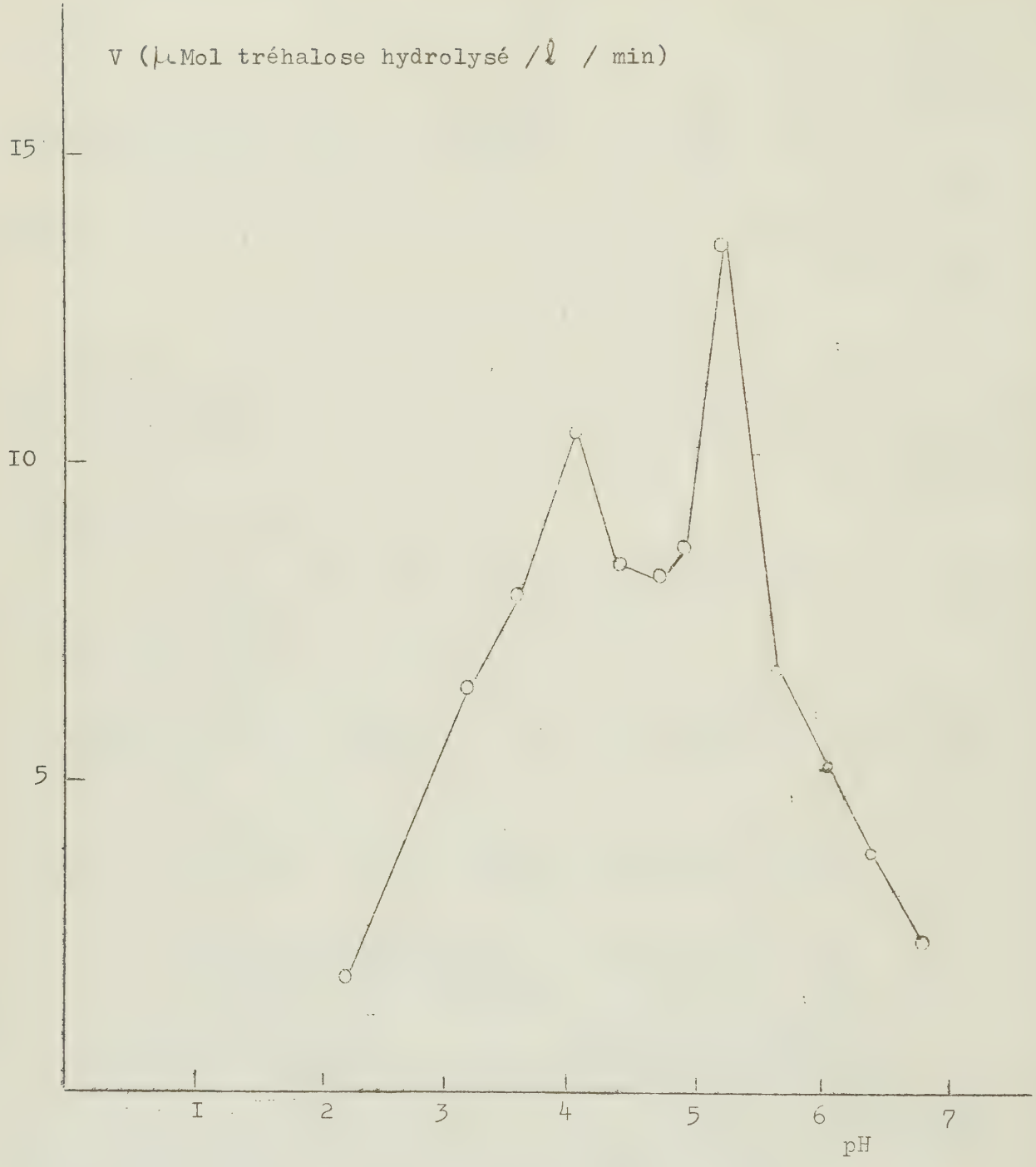


Fig. 3 : Détermination du pH optimum de la tréhalase de levures de Springer

En abscisses : l'inverse de la concentration en substrat $(\frac{1}{S})$

En ordonnées : l'inverse de la vitesse initiale de la réaction $(\frac{1}{V})$

Cette vitesse initiale est calculée en μ Mol de tréhalose hydrolysé par minute et à 37° dans un litre du milieu réactionnel.

Les résultats sont présentés dans la fig.4

(Voir Fig.4 p.suivante)

La tréhalase de levures de Springer a une constante de Michaelis assez faible , égale à 9.10^{-4} M.

4°- Essais de transfert

Nous avons recherché si la trehalase de levures possède une activité transférante comme la plupart des osidases. Nous avons utilisé les conditions dans lesquelles on avait observé un transfert optimum pour les osidases transférantes : par exemple χ-galactosidase du Café par ANAGNOSTOPOULOS, COURTOIS et PETEK (3), α-galactosidases végétales par ARNAUD (7), osidases des Huîtres par COURTOIS, PETEK et TO DONG (36).

Nous avons employé comme donateur le tréhalose et comme accepteurs possibles les alcools, oses et osides suivants :

Alcools : Méthanol
Ethanol
n. Propanol
Isopropanol

Oses et osides : Galactose et Glucose
Mannose
Fructose
Xylose
Tréhalose

Le protocole d'essai est le suivant :

0,5 ml de préparation enzymatique de levures Springer sont

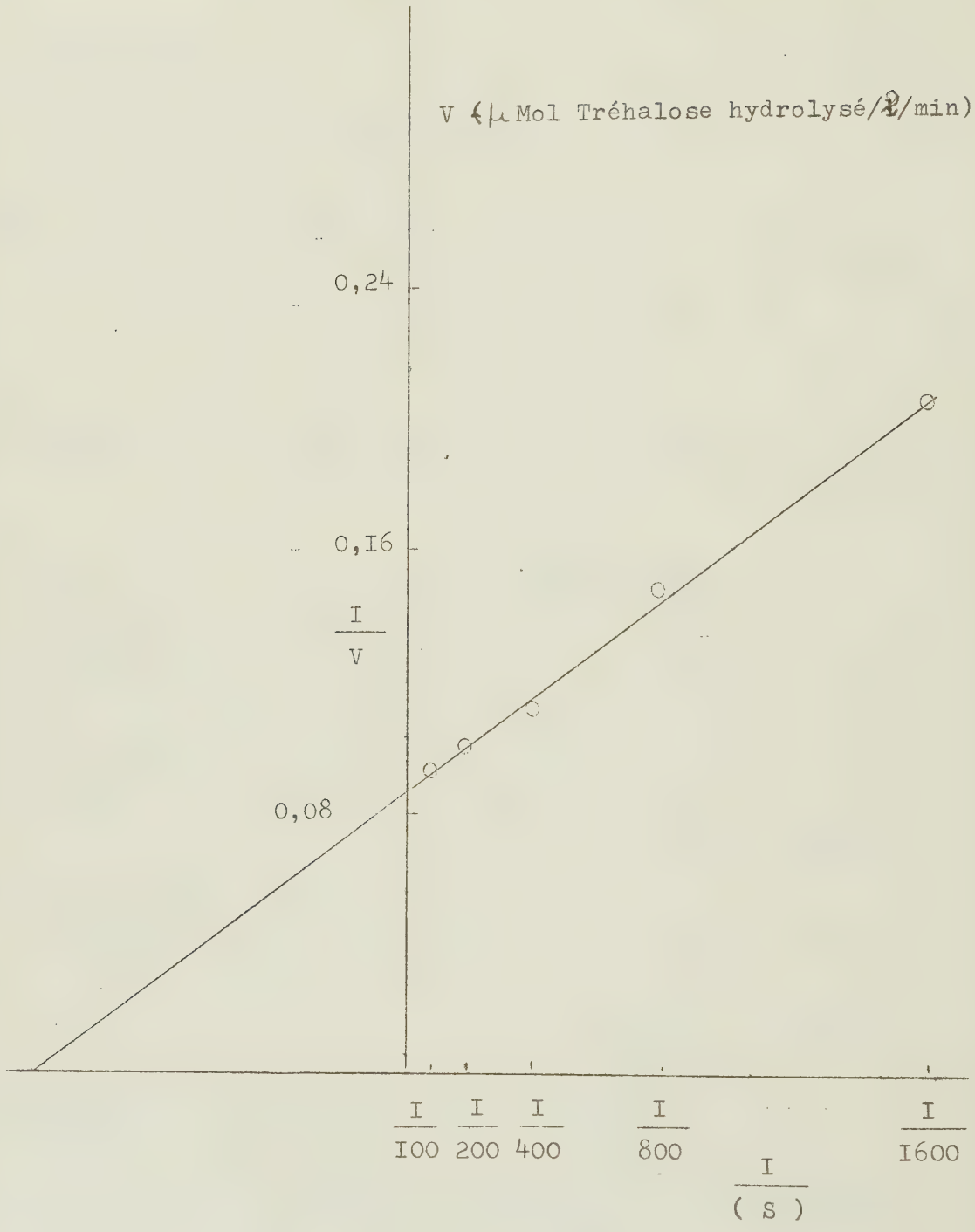


Fig. 4 : Détermination de la constante de Michaelis tréhalase de levures de Springer

$K_m = 9.10^{-4} M$

ajoutés à 5 ml d'un mélange où le donateur se trouve à des concentrations 0,04 M ou 0,08 M, et l'accepteur éventuel à des concentrations 1 M ou 2 M, le milieu réactionnel étant amené à pH 5,4 par le tampon phosphate disodique-acide citrique.

Les milieux réactionnels sont chromatographiés après des incubations à 37° de 3 h, 6 h et 24 h. Les techniques de chromatographie sont celles indiquées dans le chapitre II.

Aucun transfert n'a pu être observé, aussi bien sur les alcools que sur les oses et le tréhalose employés comme accepteurs, ceci quelle que soit la durée de la réaction (3 h à 24 h) et la concentration de l'accepteur dans le milieu (1 M et 2 M.)

Dans des conditions similaires, les α-galactosidases des graines de Café et de Luzerne et la taka-diastase sont susceptibles de transférer le radical α-galactosyl sur les monoalcools primaires, les glycols, les poly-alcools possédant des fonctions alcools primaires, et certains osides ARNAUD (7). De même, avec le méthanol accepteur COURTOIS, PETEK et TO DONG ont observé la formation par transfert d'hétérosides du méthanol avec les galactosidases α et β, les glucosidases α et β, et l'α mannosidase d'une préparation enzymatique des Huîtres (36).

DISCUSSION

La tréhalase des levures Springer est assez active. Elle possède deux pH optima, l'un égal à 4,2 et l'autre à 5,4 et une constante de Michaelis assez faible, égale à 9.10^{-4} M. L'enzyme ne possède pas d'activité transférante sur divers alcools, oses et osides essayés.

B) ETUDE DE LA TREHALASE DES GRAINES DE PLANTAGO OVATA

1) Préparation de la tréhalase des graines de Plantago ovata

Les graines de Plantago ovata (Plantaginacées) sont débarrassées de leurs enveloppes mucilagineuses par broyage au Turmix

pendant 2 minutes, puis passage au tamis n°24.

On les broie ensuite avec un petit moulin à café.

Dans un flacon on introduit :

- 25 g de graines finement broyées
- 125 ml de tampon phosphate disodique-acide citrique de pH 5
- 0,75 ml de Toluène

La solution est agitée mécaniquement à la chambre froide, pendant 48 heures. Elle est ensuite filtrée à travers une toile, centrifugée, puis dialysée pendant 3 jours contre de l'eau permutée.

On centrifuge la solution à 20.000 t/min. pendant 1 heure. On obtient une solution enzymatique brute de couleur grisâtre. La préparation est conservée à -20°C.

Dans cette préparation enzymatique COURTOIS, PETEK et TO DONG (35) ont décelé une maltase, une α -mannosidase, une α -galactosidase et une tréhalase.

2) Activité hydrolysante en fonction du pH

La gamme de pH choisie située entre 2,24 et 6,9 a été préparée comme celle utilisée pour l'étude de la tréhalase de levures (p. 28).

Protocole opératoire

Nous avons suivi l'hydrolyse des mélanges de composition suivante :

2 ml d'une solution 0,025 M de tréhalose
0,5 ml de tampon de pH variant de 2,24 à 6,9
0,5 ml d'une préparation enzymatique des graines de P.ovata
2 ml d'eau distillée

Après contact de 24 heures à 37° en présence de toluène, nous procédons au dosage du glucose libéré par la méthode de NELSON-SOMOGYI (p. 17)

Les activités sont calculées en μ Mol de tréhalose hydrolysé par minute et à 37° pour un litre de milieu réactionnel. La courbe de pH optimum de la trehalase de Plantago ovata est présentée

dans la fig.5

(Voir Fig.5 p.suivante)

Nous remarquons que la tréhalase de Plantago ovata a un seul pH optimum peu saillant, égal à 6,5, et la courbe d'activité en fonction du pH est très aplatie. Par contre, la tréhalase de levures possède deux pH optima, tous situés dans la zone plus acide et son activité est déjà fortement abaissée à pH 6,5.

3°- Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase des graines de P. ovata

Protocole opératoire :

Dans des tubes à essai stériles, nous mélangeons :

2 ml d'une solution de tréhalose $\frac{M}{40}$, $\frac{M}{80}$, $\frac{M}{160}$, $\frac{M}{320}$ ou $\frac{M}{640}$

0,5 ml du tampon acide-citrique-phosphate disodique de pH 6,5

0,5 ml d'enzyme

2 ml d'eau distillée

Les dosages sont effectués après 24 heures d'incubation au bain-marie à 37°. Le calcul de la constante se fait selon la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK (85) (fig.6)

(Voir Fig.6 p.suivante)

La tréhalase des graines de Plantago ovata a une constante de Michaelis très faible, égale à 3.10^{-4} M.

4°- Essais de transfert

Le protocole d'essai est le suivant :

Nous employons comme donateur 2 ml d'une solution de tréhalose de concentration 0,04 M ou 0,08 M dans le milieu, 1 ml de préparation enzymatique, 0,5 ml de tampon acide acétique-phosphate disodique de pH 6,2 et 1,5 ml d'accepteurs : alcools, oses et osides à des concentrations de 1 M ou 2 M. Ces accepteurs sont les mêmes que ceux employés pour l'enzyme des levures (p. 31)

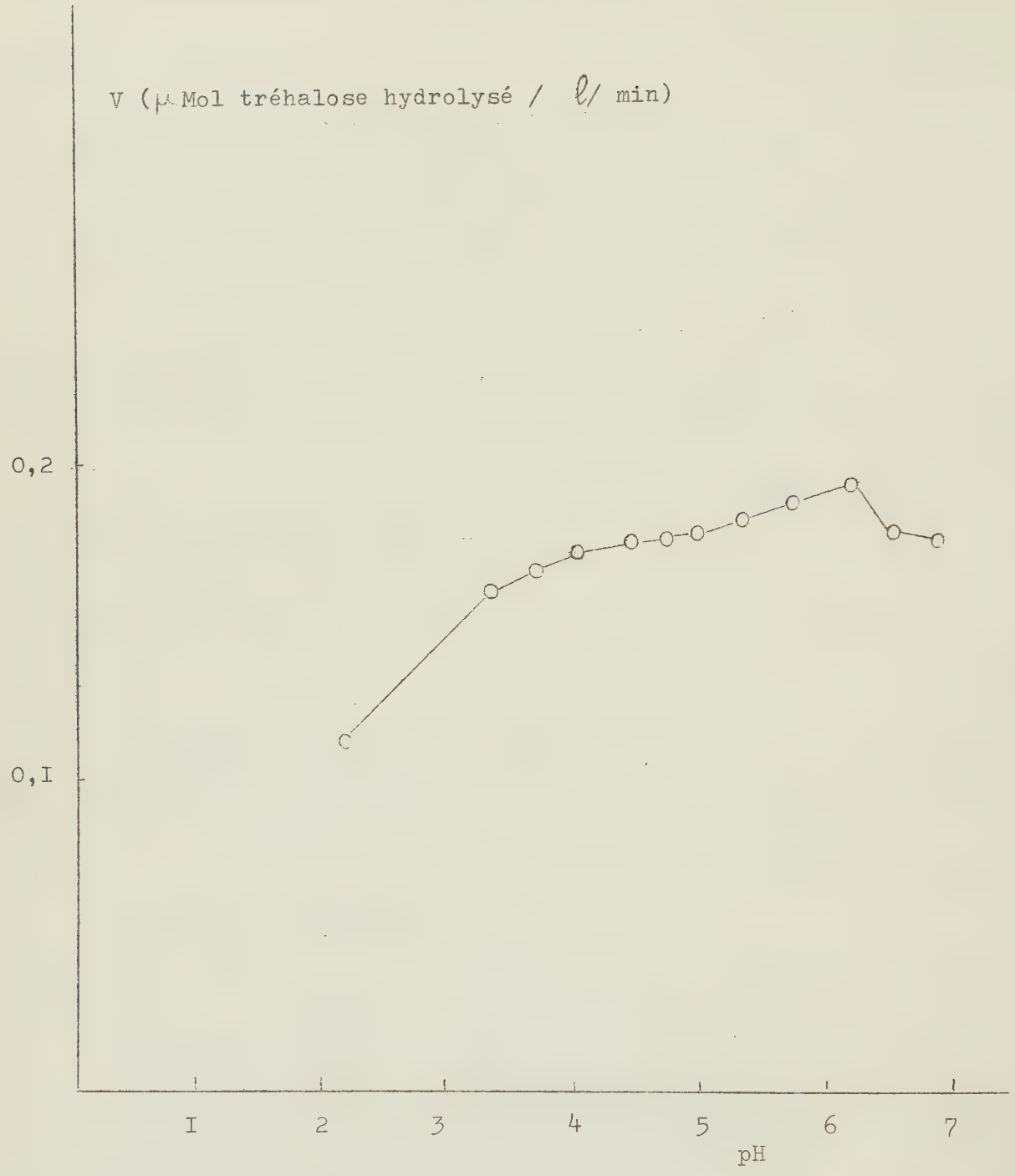


Fig. 5 : Détermination du pH optimum de la tréhalase des graines de Plantago Ovata

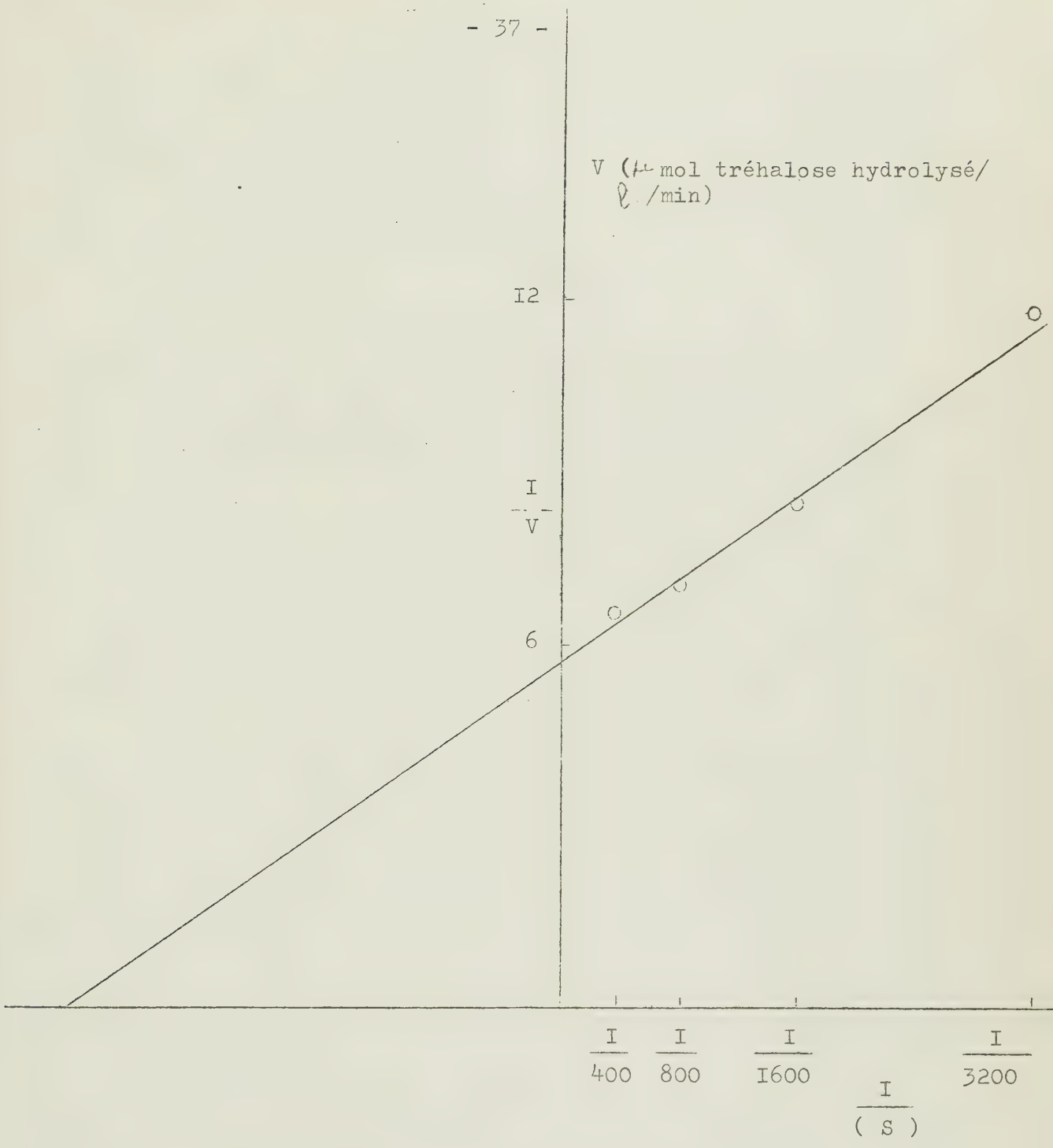


Fig. 6 : Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase des graines de Plantago Ovata

$K_m = 3.10^{-4} M$

Nous procédons à des prélèvements après 1 jour et 2 jours d'incubation à 37°C. Les corps libérés par hydrolyse ou synthétisés par transfert sont alors recherchés par chromatographie sur papier. Aucune tache n'a été observée sur les chromatogrammes, à part le glucose libéré et le tréhalose non hydrolysé.

DISCUSSION

La tréhalase des graines de Plantago a une faible activité. Elle a un pH optimum voisin de 6,2 et un Km = $3,10^{-4}$ M à son pH optimum. Les essais de transfert ont été négatifs avec cet enzyme.

-:-

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA TREHALASE DU HANNETON

-:-

I°) Préparation de la tréhalase du Hanneton

Les insectes matures (Melolontha vulgaris Coléoptères) ont été récoltés en Juin-Juillet 1961 à Orly. Ces insectes sont lavés avec une solution de chlorure de sodium à 8 p. IOOO. Ils pèsent individuellement, en moyenne, I,2 gr. 200 g. de Hannetons lavés sont broyés au Turmix et agités pendant 24 heures à la chambre froide, dans 5 fois leur poids de solution de chlorure de sodium à 8 p. IOOO. L'extrait est centrifugé et dialysé contre de l'eau distillée pendant 2 jours.

Cet extrait dialysé, centrifugé de nouveau, est précipité par le sulfate d'ammonium à 70 p. IOO de saturation. Le mélange est abandonné à la chambre froide pendant 24 heures, puis centrifugé. Le précipité est dissous dans un volume d'eau distillée égal au quart du volume initial de l'extrait. La solution obtenue est dialysée contre de l'eau permutée pendant 24 heures. L'extrait dialysé est relargué de nouveau à 50 p. IOO de saturation par le sulfate d'ammonium en milieu neutre. Le mélange est laissé à la chambre froite pendant 24 heures et centrifugé. Le précipité est redissous dans IOO ml d'eau distillée, puis dialysé à nouveau.

La solution enzymatique obtenue est conservée à - 20°C.

2°) Activité hydrolysante en fonction du pH

La gamme de pH choisie se situe entre 2,24 et 7,60. Cette gamme a été préparée avec un tampon acide citrique-phosphate disodi-

que de Mc ILVAINE

Composition des essais :

2 ml d'une solution 0,025 M de tréhalose

0,5 ml de tampon Mc ILVAINE de pH variant de 2,24 à 7,6

0,5 ml d'une préparation enzymatique de Hanneton diluée au I/6 correspondant à I66 mg. d'insecte complet.

2 ml d'eau sistillée.

L'enzyme était ajouté au dernier moment dans le milieu réactionnel. Les essais ont été effectués dans un thermostat à 37°. La durée de la réaction était de 30 minutes, aprés quoi, le glucose libéré était dosé par la méthode au réactif cupro-alcalin de Nelson-SOMOGYL.

La courbe de pH optimum est présentée dans la fig. 7.

(Voir Fig. 7 page suivante)

La tréhalase du Hanneton a un pH omtimum assez proche de la neutralité et égal à 6,5. Ce pH optimum a la même valeur que celui obtenu dans le cas de la tréhalase de Plantago ovata.

3°) Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase du Hanneton.

Protocole des essais :

2 ml d'une solution de tréhalose $\frac{M}{40}$, $\frac{M}{80}$, $\frac{M}{160}$, $\frac{M}{320}$, ou $\frac{M}{640}$

0,5 ml du tampon acide citrique-phosphate disodique de pH 6,5

0,5 ml d'enzyme

2 ml d'eau distillée.

Les dosages sont effectués aprés 30 minutes d'incubation au bain-marie à 37°. Le calcul de la constante se fait selon la méthode graphique de LINEWEARVER et BURK. Les résultats sont présentés dans la fig. 8. Le Km de la tréhalase de Hanneton est de 7.10^{-4} M, valeur trés proche de celle des levures de Sptringer, et trois fois plus grande que celle des graines de Plantago ovata.

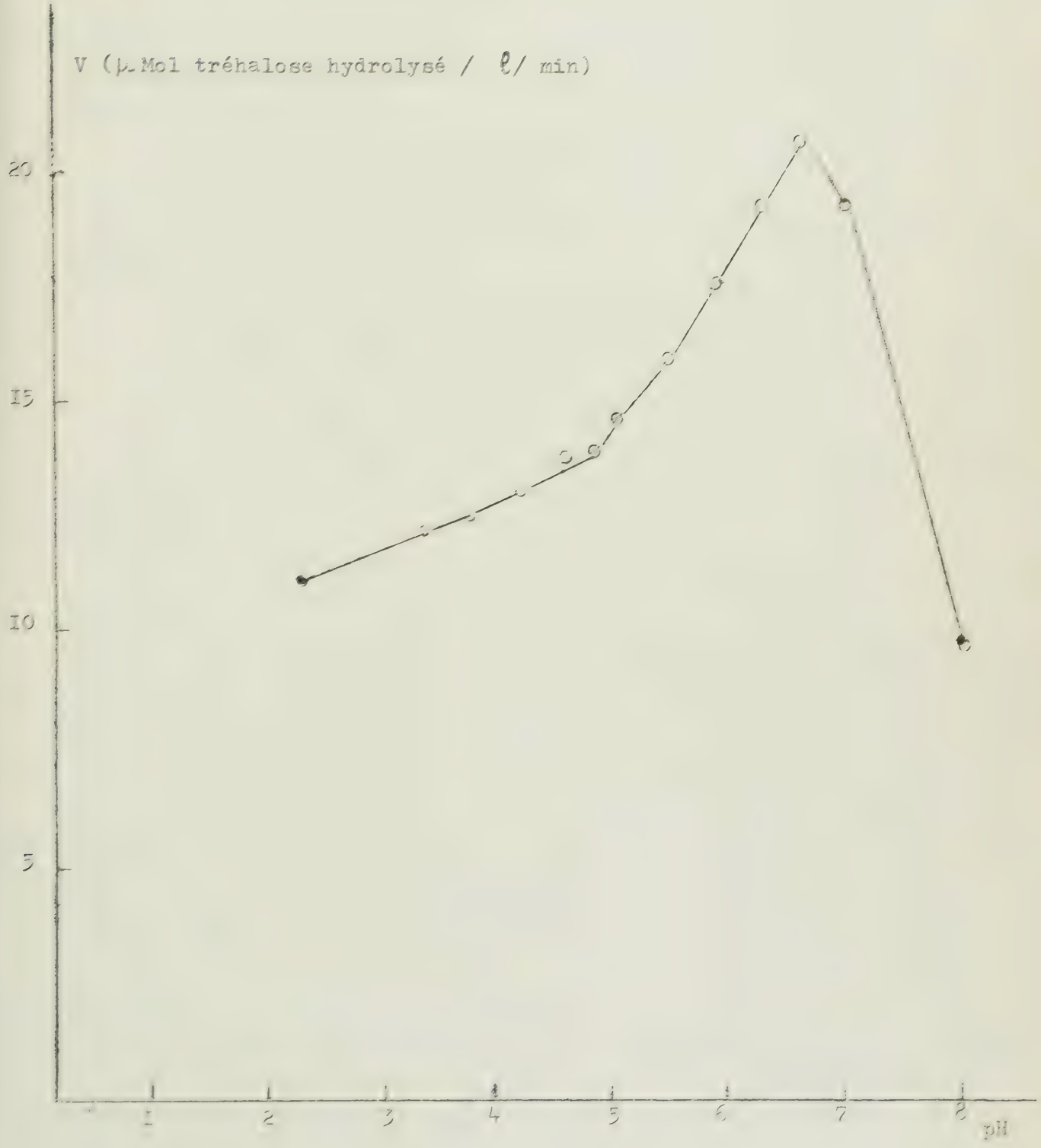


Fig. 7 : Détermination du pH optimum de la tréhalase du Hanneton

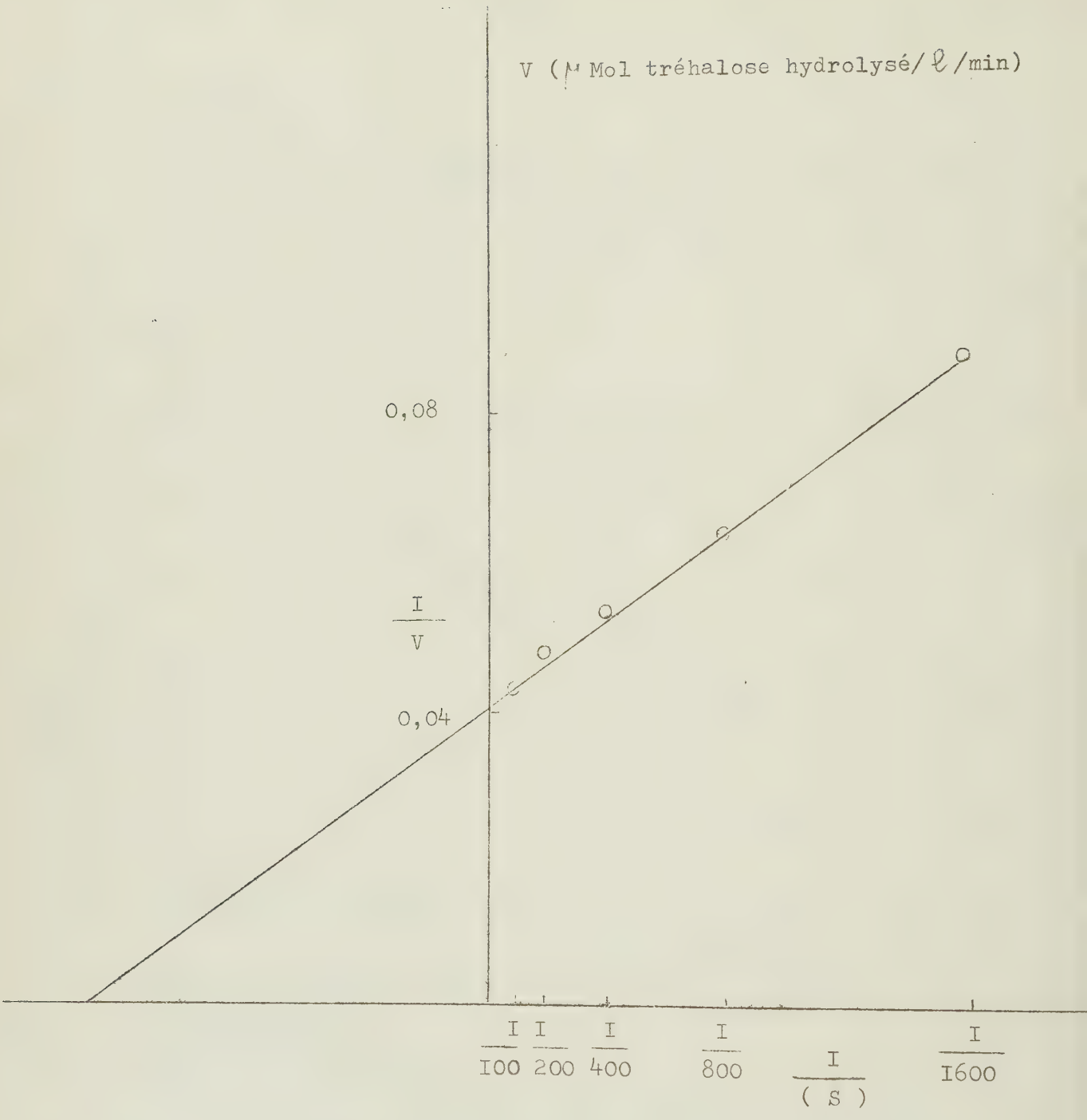


Fig. 8 : Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase du Hanneton.

4°) Etude de l'activité transférante de la tréhalase du Hanneton.

Pour déceler l'activité transférante de la tréhalase du Hanneton, nous nous sommes placé dans des conditions opératoires identiques à celles utilisées pour l'étude des tréhalases de levures et de Plantago ovata.

Le protocole opératoire est le suivant :

0,5 ml de solution tampon de pH 6,5

accepteurs éventuels q.s. pour avoir des concentrations IM ou 2M dans le milieu.

I ml de tréhalose 0,2 M ou 0,4 M

0,5 ml de préparation enzymatique

0,05 ml de toluène

Eau distillée q.s.p. 5 ml

Les accepteurs: alcools, oses ou osides, sont les mêmes que ceux employés dans le cas des essais de transfert avec les tréhalases déjà citées.

Les milieux réactionnels sont chromatographiés aprés I h., 3 h., 6 h. et 24 h. d'incubation à 37°.

Nous n'avons pas pu déceler de corps formés par transfert.

Les travaux de ARNAUD sur la spécificité d'accepteurs dans le des galactosidases végétales ont montré que le saccharose est un bon accepteur. Parmi les divers oses, osides et alcools étudiés, le saccharose est un accepteur agissant même à faible concentration (7). De même, PAZUR et coll. ont signalé que le saccharose est un bon accepteur pour les β -galactosidases (89).

Les résultats négatifs obtenus dans nos essais de transfert signalés jusqu'à présent pourraient tenir à l'utilisation d'accepteurs qui ne sont pas actifs. Ceci nous a amené à tenter le transfert sur le saccharose avec la tréhalase du Hanneton.

L'emploi du saccharose comme accepteur nécessite une préparation enzymatique dépourvue d'invertase. En effet, l'invertase peut hydrolyser le saccharose ou même provoquer des transferts sur une se-

conde molécule de saccharose ou sur le tréhalose.

L'utilisation de la tréhalase du Hanneton dans les essais de transfert sur saccharose exige une purification préalable pour obtenir une préparation de tréhalase dépourvue d'activité invertasique.

I) PURIFICATION DE LA TREHALASE DU HANNETON

Nous avons tenté de purifier la tréhalase dans la préparation brute par la méthode de KALF et RIEDER (78).

Cette purification consiste en un chauffage à 65° C d'une préparation brute pour inactiver la maltase, suivi d'un relargage par le sulfate d'ammonium, et finalement d'une précipitation par l'acétone.

a) Préparation enzymatique brute

50 g de Hannetons congelés sont broyés et introduits dans 300 ml de tampon disodique-acide citrique de pH 6,5. Le mélange est homogénéisé pendant 2 minutes dans un broyeur, puis agité mécaniquement 30 minutes dans un flacon. La solution est centrifugée pendant 20 minutes à 6000 t.min. pour enlever les débris cellulaires. Le liquide surnageant brunâtre (250 ml) renferme la maltase et la tréhalase.

b) Chauffage à 65°C.

Dans 250 ml de la préparation brute à pH 6,5, on ajoute 44 g de sulfate d'ammonium. On agite jusqu'à dissolution. La solution est alors saturée à 30 p. I00. Aprés 3 heures, le précipité qui se forme est enlevé par centrifugation. Le liquide surnageant est porté au bain-marie à 65° pendant 5 minutes avec agitation . La solution est refroidie rapidement dans un bain d'eau glacée. Le précipité formé est enlevé par centrifugation.

Le liquide surnageant présente maintenant une trés faible activité maltasique, alors que l'activité tréhalasi ue demeure assez forte (environ 80 p. I00 de l'activité initiale).

c) Précipitation par le sulfate d'ammonium

I5 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés avec agitation dans

250 ml de préparation refroidie à 0°C aprés traitement à 65°C, pour obtenir une saturation de 40 p. I00 en sulfate d'ammonium. Aprés I5 minutes, le mélange est centrifugé. Le précipité est séparé et 33 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés dans le liquide surnageant. La saturation de la solution est maintenant de 70 p. I00 en sulfate d'ammonium. Cette solution est abandonnée I5 minutes à 0°.

Le précipité est reccueilli par centrifugation, dissous dans 30 ml du tampon de pH 6, 5. La solution obtenue est dialysée à la chambre froide (4°C) contre une solution de tampon de Mc ILVAINE (73) à pH 6,5 jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. Il reste encore une activité maltasique dans le liquide surnageant, contrairement au résultat observé dans le cas de la fausse teigne des ruches Gallera mellonella (78).

d) Précipitation par l'acétone

La solution obtenue après dialyse est refroidie à -I° dans un bain d'eau glacée et salée et 23 ml d'acétone préalablement refroidie à -20°C sont ajoutés dans l'intervalle de I5 à 20 minutes. Le précipité est éliminé par centrifugation; 29 ml d'acétone sont versés lentement et en agitant dans le liquide surnageant. Le précipité obtenu est collecté par centrifugation et dissous dans I5 ml de tampon pH 6,5.

La purification par cette méthode ne donne pas les résultats attendus. Nous avons obtenu une préparation partiellement enrichie en tréhalase, mais les autres activités osidasiques n'ont pas complètement disparu, notamment l'activité de l'invertase.

Les pourcentages d'hydrolyse du tréhalose, du saccharose et du maltose (concentration 0,0I M dans le milieu) par 0,5 de la préparation enzymatique obtenue aprés la précipitation par l'acétone sont respectivement de 82 p. I00, 3I p. I00 et I0 p. I00 à pH 6,5 pour I heure d'hydrolyse à 37°C.

Nous avons ainsi été amené à utiliser la chromatographie sur

colonne d'alumine préconisée par PETEK et TO DONG (92).

II) CHROMATOGRAPHIE DES OSIDASES DU HANNETON SUR COLONNE D'ALUMINE

I50 g. d'alumine Merck, lavés par décantation d'abord avec 5 ml d'eau distillée, puis avec 0,5 l. de tampon (acide citrique-phosphate disodique de pH 3,8 Mc ILVAINE) sont versés dans une colonne de diamètre intérieur de 2,5 cm, munie à sa partie inférieure effilée d'un morceau de coton hydrophile recouvert d'une mince couche de célite.

L'opération se fait à la chambre froide à + 4°C.

A l'aide d'un ballon à décantation au-dessus de la colonne, nous laissons écouler le tampon de pH 3,8 à travers la colonne d'alumine à la vitesse de 0,5 ml/min. Par suite du tassement régulier de l'alumine, sa hauteur dans la colonne, initialement de 37 cm, se stabilise à 33 cm.

Nous arrêtons le lavage lorsque le pH du liquide sortant atteint 3,8.

20 ml de la préparation enzymatique brute préparée comme indiqué dans la page 44 sont introduits dans la colonne. Aprés absorption totale, la colonne est éluée avec 2 litres de tampon de pH 3,8. Nous ajoutons ensuite avec précaution le deuxième tampon d'élution de pH 4,4. La vitesse d'écoulement est de I ml/2 min.

Les fractions éluées (5 ml chacune) sont recueillies dans 250 tubes par un collecteur de fractions ERAL.

La protéine éluée est dosée par l'absorption ultra-violette à 280 mμ

Les courbes d'élution des osidases du Hanneton sont présentées dans la fig.9.

(Voir Fig.9 page suivante)

Dans la première élution nous avons obtenu de faibles acti-

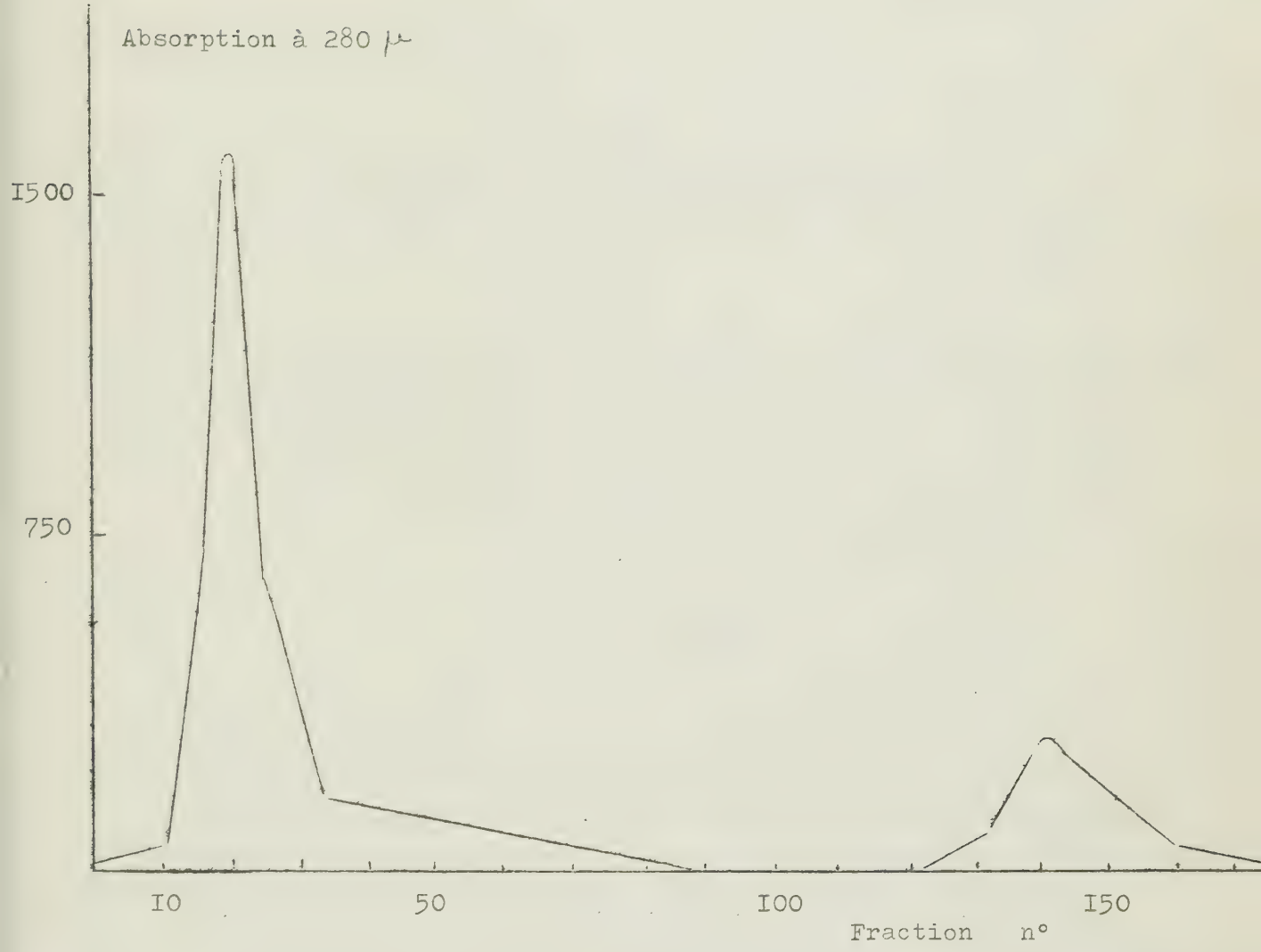


Fig. 9 : Courbes d'élution des oxidases du Hanmeton.

vités, maltasique et invertasique.

La tréhalase se trouve dans la deuxième élution à pH 4,4; elle n'est pas associée à la fructosidase.

Les élutions ultérieures avec des tampons de pH plus alcalins (5 et 5,6) nous ont donné des fractions présentant une faible activité tréhalasique mais possédant en outre des activités dues à d'autres osidases.

Les fractions (entre n° I42 et n° I56) correspondant à la deuxième élution sont collectées, dialysées contre de l'eau distillée pendant 24 h La solution enzymatique obtenue est employée pour des essais de transfert de composition suivante :

I ml de tréhalose 0,2 M
0,5 ml de tampon de pH 6,5
0,5 ml ou I ml de saccharose 2 M
25 ml d'enzyme dialysé
0,05 ml de toluène
eau distillée q.s.p. 5 ml

Le milieu est chromatographié aprés 6 heures, I2 heures, I jour et 2 jours d'incubation à 37°C.

Nous n'avons pu obtenir aucun transfert sur le saccharose qui est pourtant un bon accepteur pour les autres osidases.

DISCUSSION

La tréhalase d Hanneton est trés active.Son pH optimum est égal à 6,5 et son Km a pour valeur 7.10^{-4} M. C'est un enzyme spécifiquement hydrolysant et qui ne possède pas de propriété transférante.

CHAPITRE V

DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES TREHALASES

-:-

Nous envisagerons successivement trois ordres de déterminations effectuées avec les trois tréhalases :

A) pH optimum

B) Constante de Michaëlis

C) Impossibilité de déceler une action transférante.

A - pH optimum

Dans le tableau III nous avons groupé, avec nos résultats, ceux de différents auteurs ayant determiné le pH optimum de tréhalases. Les pH optima sont tous situés en milieu faiblement acide, ceci quelle que soit l'origine de l'enzyme : levures, plantes, insectes, porc. Seule la levure a fourni une courbe avec deux optima, l'un à pH 4,13 et l'autre, plus saillant, à pH 5,35.

Il est possible que la levure contienne deux tréhalases distinctes. Les chrysalides du Ver à Soie ont fourni à SAITO (96) deux fractions distinctes de tréhalase séparées sur colonne de diéthylaminoéthylcellulose ; ces deux fractions avaient le même pH optimum.

Les courbes que nous avons obtenues avec la levure et avec le Hanneton sont assez typiques ; la levure conduit à une courbe avec deux optima comme pour deux isoenzymes associés. Les courbes de pH optimum publiées pour le Ver à Soie (96), la Fausse teigne des ruches (78) la Fourmi royale (60) et l'intestin de Porc (42) ont également une forme classique.

Tableau n°III

pH optimum de la tréhalase

Origine de l'enzyme	pH optimum	Référence
Levure	4,13 et 5,35	ce travail
Graines de Plantain	6,5	-id-
Hanneton	6,5	-id-
Ver à Soie (deux enzymes distincts par chromatographie sur colonne)	5,2	SAITO (96)
Fausse teigne des ruches	5,5	KALF et RIEDER (78)
Fourmi Royale	5,6	FRIEDMAN (60)
Muqueuse intestinale de Porc	6,0	DAHLQVIST (42)

Seule la courbe établie avec la tréhalase de Plantago présente une forme assez aplatie qui s'observe d'ailleurs assez fréquemment avec d'autres glucidases de graines.

B - CONSTANTE DE MICHAELIS K_m

Dans le tableau IV nous avons réuni les valeurs de K_m que nous avons mesurées avec nos trois préparations enzymatiques et celles que nous avons relevées dans la littérature. La constante de dissociation de la combinaison tréhalase-tréhalose est très faible, en d'autres termes les affinités représentées par les inverses $K_M = \frac{I}{K_m}$ sont très élevées.

Elles sont en général plus élevées que pour d'autres glucidases. A titre indicatif, figurent dans le tableau V les valeurs de la constante de Michaelis calculées avec plusieurs glucidases ; ces déterminations ont été effectuées au cours de ces dernières années au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

La valeur de la constante de Michaelis K_m varie avec l'origine de l'enzyme, le pH et, pour le même enzyme maintenu à pH constant, avec la structure du substrat COURTOIS (24). Il n'est pas possible de faire une comparaison trop serrée entre les données du tableau IV et celles plus disparates du tableau V. Un examen même sommaire des deux tableaux montre de suite que la combinaison tréhalose-tréhalase est beaucoup moins dissociée que les combinaisons oside - osidase du tableau V.

Les K_m pour la tréhalase s'étagent de $1,3.10^{-4}$ M pour G. mallonella à 3.10^{-3} M pour la muqueuse intestinale du Porc.

Avec les autres glucidases, les valeurs s'étagent de 5.10^{-4} M pour une des α-galactosidases de Plantago à $1,6.10^{-2}$ M pour l'α mannosidase des Huîtres.

En moyenne, la combinaison tréhalose - tréhalase est à peu

Tableau n°IV

Constante de Michaelis K_m de la tréhalase

Origine de l'enzyme	pH de l'essai	température	Valeur calculée de K_m	Référence
Levure	5,35	37°	9.10^{-4} M	ce travail
Graines de Plantain	6,5	37°	3.10^{-4} M	-id-
Hanneton	6,5	37°	7.10^{-4} M	-id-
Ver à Soie premier enzyme	5,2	30°	$4,4.10^{-4}$ M	SAITO (96)
Ver à Soie deuxième enzyme	-id-	-id-	$4,7.10^{-4}$ M	-id-
Fausse Teigne des ruches	5,5	30°	$1,3.10^{-4}$ M	KALF et RIEDER (78)
Fourmi Royale	5,6	32°	$6,7.10^{-4}$ M	FRIEDMAN (60)
Muqueuse intestinale de Porc	6,0	37°	3.10^{-3} M	DAHLQVIST (42)

Tableau n°V

Constantes de Michaelis de diverses glucidases à 37°

Enzyme	Origine	Substrat	pH de l'essai	Valeur calculée de K_m	Référence
α glucosidase	Huître	α phényl-D-glucoside	4,5	5.10^{-3} M	COURTOIS, PETEK et TO DONG (36)
β glucosidase	Huître	β phényl-D-glucoside	4,5	4.10^{-3} M	-id- (36)
α galactosidase	graines de Plantago Ovata ler enzyme	α phényl D galactoside	5,1	1.10^{-3} M	TO DONG (103)
-id-	-id- 2e enzyme	-id-	-id-	5.10^{-4} M	-id- (103)
-id-	graines de Café ler enzyme	-id-	-id-	$2,2.10^{-3}$ M	PETEK et TO DONG (92)
-id-	-id- 2e enzyme	-id-	-id-	$1,0.10^{-3}$ M	-id- (92)
-id-	enzyme brut de Café	mélibiose	4,0	$6,6.10^{-3}$ M	COURTOIS, WICKSTRÖM et le DIZET (38)
-id-	-id-	raffinose	-id-	$3,0.10^{-3}$ M	-id- (38)
-id-	-id-	plantéose	-id-	$3,0.10^{-3}$ M	-id- (38)
-id-	Rein de Porc	α phényl D galactoside	4,8	$1,02.10^{-2}$ M	DEBRIS, COURTOIS et PETEK (47)
-id-	-id-	raffinose	-id-	$5,3.10^{-3}$ M	-id- (47)
β galactosidase	Huître	β phényl-D galactoside	4,5	$5,0.10^{-3}$ M	COURTOIS, PETEK et TO DONG (36)
α mannosidase	-id-	α phényl-D mannoside	-id-	$1,6.10^{-2}$ M	-id- (36)
β mannosidase	-id-	β phényl D mannoside	-id-	$8,0.10^{-3}$ M	-id- (36)

près dix fois moins dissociée que les combinaisons oside - osidase du tableau V.

De ces données, nous retiendrons que la tréhalase présente une très forte affinité pour le tréhalose ; affinité nettement supérieure à celles que manifestent la plupart des autres osidases vis-à-vis de leurs substrats.

C - ACTION TRANSFERANTE

DAHLQVIST (42) n'avait pu déceler aucune action transférante de la tréhalase de la muqueuse intestinale de Porc. Nous obtenons les mêmes résultats négatifs avec trois préparations de tréhalase d'origine aussi variées qu'une levure, une graine et un insecte. Ainsi quatre tréhalases, deux d'origine végétale et deux d'origine animale se sont révélées dépourvues de toute action transférante. S'agit-il d'une coïncidence résultant du fait que DAHLQVIST et nous avons choisi quelques-unes des préparations de tréhalase incapables de transférer ? Une telle opinion semble difficile à admettre et nous voulons discuter ce point.

Nous avons délibérément choisi des matières premières où la tréhalase n'est pas la seule glucidase. Dans ces matières premières, les glucidases associées possèdent une action transosylante.

a) La levure contient une invertase dont l'action transfructosylante a été l'objet d'au moins une centaine de publications récentes et des revues générales de BACON (13), DEDONDER (49), EDELMAN (53).

b) La préparation enzymatique de Plantago Ovata contient, à côté de la tréhalase, une α-galactosidase.

COURTOIS, PETEK et TO DONG (35) viennent de montrer que l'α-galactosidase de Plantago transférait le groupement α-D-galactopyranosyl de l'αphénylgalactoside donateur sur le saccharose accepteur ; il se forme un mélange de deux monogalactosides du saccharose : la raffinose : galactosido-6-G-saccharose et le plantéose :

galactosido -6- F - saccharose.

c) Nos connaissances sur l'action transférante des glucidases d'insectes demeurent encore assez restreintes. Cependant il n'a jamais été signalé qu'elles avaient des actions transosylantes les différenciant sur ce point des autres glucidases. La glucosido-invertase de l'Abeille a permis d'obtenir à partir du saccharose donateur divers α glucosides. COURTOIS, CHARARAS et DEBRIS (31) ont mis en évidence une glucosido-invertase dans un Coléoptère xylophage, l'Ips typographus.

Cet enzyme possède une action transosylante ; avec le saccharose donateur et le méthanol accepteur il se forme par transfert de l'α -méthyl-glucoside.

Nous avons d'ailleurs décelé dans le Hanneton une fructodisoinvertase ; ces expériences sont décrites dans le chapitre suivant ; avec le saccharose donateur et le méthanol accepteur il est synthétisé par transfert du β méthylfructofuranoside.

d) Enfin pour en revenir à la découverte initiale de DAHLQVIST, nous signalerons que la muqueuse intestinale du Porc renferme aux côtés de la tréhalase dépourvue d'action transférante diverses glucidases dont plusieurs α glucosidases (maltases distinctes, isomaltase, glucosido-invertase).

Toutes ces α glucosidases ont une action transférante comme l'ont montré une série de publications de DAHLQVIST (39) (40) (42) (46).

Il reste tout de même un dernier point à préciser ; les résultats négatifs n'imposent pas la conviction au même titre que des essais positifs. L'on peut toujours envisager que l'absence de transfert par la tréhalase provient de ce que l'enzyme n'a pas été placé dans des conditions permettant d'observer une action transosylante.

La possibilité d'une telle objection n'avait pas échappé à DAHLQVIST ; il fait remarquer qu'il n'a pas obtenu de transfert

dans les conditions expérimentales exactement similaires à celles qui lui ont permis d'obtenir des transosylations avec les autres α-glucosidases de l'intestin.

Nous sommes à même de fournir la même réponse. Nos essais de transfert ont été réalisés dans des conditions opératoires employées depuis dix ans dans ce laboratoire, et qui ont permis de suivre maintes synthèses par transosylation, nous ne signalerons que les multiples opérations de transfert de galactose par des α-galactosidases d'origines diverses (2) (3) (34), par la β glucosidase de l'émulsine d'amandes (32), par les α et β glucosidases, α et β galactosidases de l'Huître (36).

Dans nos essais de transfert avec la trehalase, nous avons toujours eu des résultats négatifs en faisant varier :

I) l'origine de l'enzyme

2) la nature de l'accepteur éventuel, nous avons choisi différents composés hydroxylés qui sont en général des accepteurs dans les réactions de transosylation : alcools acycliques, hexoses et un pentose.

Le saccharose n'a pas été utilisé comme accepteur éventuel dans le cas de la levure et de l'enzyme de Plantago car ce disaccharide était hydrolysé par ces preparations. Nous avons tout spécialement purifié la tréhalase du Hanneton pour obtenir une préparation dépourvue d'activité invertasique.

La tréhalase purifiée était dépourvue d'action transosylante sur le saccharose. Cependant le saccharose est un excellent accepteur, peut-être le meilleur, pour les réactions de transosylation. C'est en effet un accepteur avec les β fructofuranosidases, BACON (13) α glucosidases, MANNERS (86), β glucosidases, MANNERS (86), COURTOIS et LECLERC (32), α galactosidases, ARNAUD (7), COURTOIS (25) (26) (27) β galactosidases, WALLENFELS (104).

3) les concentrations de l'accepteur ; ceci afin de ne pas nous trouver éventuellement à des concentrations où il pourrait

inactiver l'enzyme.

4) les durées de réaction ; certains transferts s'observent dès le début de la réaction, tandis que d'autres sont plus tardifs à déceler. Un autre donateur ne pouvait être envisagé puisqu'il apparaît que le tréhalose est le substrat spécifique de la tréhalase.

Nous pouvons donc au moins conclure de façon ferme que, dans les conditions habituelles des réactions de transosylation, il n'a pas été observé de transferts par la tréhalase. Sur ce point, la tréhalase se differencie donc nettement des autres osidases agissant sur les oligosaccharides.

Essais d'interprétation de l'absence d'action transférante de la tréhalase

Nous procéderons à la discussion de quelques points susceptibles d'apporter des informations sur l'absence d'action transférante de la tréhalase.

Nous envisagerons ainsi successivement :

1) l'énergie incluse dans la liaison osidique de la molécule de tréhalose
2) la structure symétrique particulière de ce disaccharide
3) les hypothèses sur la configuration du groupe actif dans la molécule de la tréhalase.

I) Energie incluse dans la liaison osidique

La conception de liaisons phosphorées riches en énergie représentées par P~ a joue un rôle prépondérant dans le développement de nos conceptions sur le métabolisme intermédiaire.

Il est encore prématuré de juger si ces conceptions auront d'aussi fructueuses répercussions dans le domaine des glucidases. Elles se sont déjà montrées fort prometteuses dans l'étude des enzymes agissant sur les fructosides.

La liaison osidique du saccharose est du type lactol-lactol ; c'est un mode de liaison tres rare parmi les glucides naturels. Le

seul autre disaccharide aussi répandu ayant une liaison lactol-lactol est précisément le tréhalose.

La variation d'énergie libre (ΔF°) dans l'hydrolyse du saccharose est d'au moins -6.600 calories ; la liaison lactol-lactol du saccharose est une liaison osidique riche en énergie. DEDONDER (48) a proposé de représenter ainsi schématiquement le saccharose Fru $\sim$ Glu.

La variation d'énergie libre est plus faible dans l'hydrolyse des liaisons lactol-alcool. Pour les disaccharides (I $\rightarrow$ 4) comme le maltose et (I $\rightarrow$ 6) comme l'isomaltose ΔF° serait de l'ordre de 1000 à 4000 calories.

KALCKAR (77) a calculé que ΔF° dans l'hydrolyse du maltose est d'environ 4000 calories.

FEINGOLD, AVIGAD et HESTRIN (55) ont présenté des arguments permettant d'envisager que ΔF° pour l'hydrolyse d'une liaison osidique est nettement plus faible lorsque le groupe réducteur est uni à une fonction alcool primaire que lorsqu'il est uni à une fonction alcool-secondaire.

On peut aussi considerer que les liaisons osidiques sont susceptibles d'être classees dans l'ordre suivant d'après leur richesse croissante en énergie :

Lactol-alcool primaire < lactol-alcool secondaire < lactol-lactol

Ceci est en accord avec les résultats des expériences de transosylation où l'ose se fixe sur la fonction alcool d'un ose ou d'un saccharide accepteurs. La fixation se fait sur une des fonctions alcool primaire de l'accepteur de préférence aux fonctions alcool secondaire. Avec les α-galactosidases de Café, Luzerne, Plantago la fixation se fait presque exclusivement sinon même exclusivement sur une fonction alcool primaire, (7) (35) (27).

Il résulte de ces considérations que le tréhalose devrait avoir une liaison lactol-lactol riche en énergie. CABIB et LELOIR

(22) ont décrit un enzyme qui transfère le glucose de l'uridinediphosphoglucose (UDPG) sur le glucose -6-phosphate, il se forme du tréhalosephosphate et de l'uridinediphosphate (UDP) selon le schéma UDPG + glucose -6-phosphate → UDP + tréhalosephosphate.

L'équilibre de la réaction est deplacé dans le sens de la synthèse de tréhalosephosphate et la réversibilité de la réaction n'a pu être démontrée.

CABIB et LELOIR ont calculé d'après ces données expérimentales la valeur de ΔF^{o} dans l'hydrolyse de la liaison osidique du tréhalose. Elle ne devrait pas dépasser -4400 calories.

Cette valeur de la variation d'energie libre est assez nettement inférieure à celle retenue dans la liaison osidique du saccharose : -6600 calories. Toutefois CABIB et LELOIR font remarquer que ΔF^{o} pour l'hydrolyse du saccharose représente la somme de deux réactions : I) la rupture de la liaison osidique 2) la transformation partielle du fructofuranose dextrogyre libéré du saccharose en fructopyranose, qui est lévogyre. Cette seconde transformation correspond en valeur absolue à 850 calories.

Ainsi ΔF^{o} serait pour la liaison osidique du saccharose de (-6600) -(-850), soit - 5750 calories, ce qui fait environ -1750 calories de différence avec le saccharose.

Ceci pourrait expliquer que le tréhalose soit un moins bon donateur que le saccharose, mais ne peut expliquer que le tréhalose n'agisse pas comme donateur. D'autres disaccharides ayant des valeurs de ΔF^{o} inférieures en valeur absolue à celle du tréhalose agissent comme donateurs. Le maltose a même selon KALCKAR (77) un ΔF^{o} de - 4000 calories, c'est-à-dire égal à celui du tréhalose. Le maltose est un excellent donateur ; la maltase agissant sur le maltose transfère sur le glucose pour former de l'isomaltose, elle transfère sur le maltose pour donner soit du maltotriose (à liaisons (I →4) entre les α glucoses), soit du panose α glucosido - (I →6) α glucosido (I →4) glucose ; c'est-à-dire du maltose

substitué par un α glucose.

Sur la fonction alcool primaire de l'extrémité non réductrice, MANNERS (86) a relevé dans sa revue au tableau II, p.1792, une liste d'enzymes variés réalisant des transosylations avec le maltose fonctionnant soit comme donateur, soit comme accepteur d' α glucopyranosyl (Tableau VI).

Tableau n°VI

Oligosaccharides synthétisés à partir du maltose par diverses préparations enzymatiques

Oligosaccharides	Enzymes
Maltotriose et saccharides supérieurs correspondants	Foie du rat Plasma du boeuf Escherichieae coli
Isomaltose, isomaltotriose, panose et oligosaccharides correspondants	Aspergillus Oryzae Aspergillus niger Penicillium chrysogenum
Maltotriose, panose, maltotétraose et 6^3 - α - glucosyl-maltotriose	Cladophora rupestris Saccharomyces cerevisiae Tetrahymena pyriformis

Les résultats obtenus dans la réversibilité d'action des α et β glucosidases tendent également à indiquer que la liaison osidique du tréhalose est relativement riche en énergie.

BOURQUELOT et BRIDEL avaient montré que l'émulsine d'amandes agissant sur une solution de glucose donnait naissance à du gentiobiose β glucosido -(I → 6) glucose.

L'application des techniques de séparation sur colonne a montré que le mélange réactionnel etait plus complexe. PEAT, WHELAN

et HINSON (90) ont pu caractériser cinq disaccharides synthétisés par la β glucosidase selon la réaction : glucose + glucose $\xrightleftharpoons{\text{émulsine}}$ disaccharides + eau.

Après cinq semaines de contact à 35°, ils ont réussi à séparer 7,0 g de gentiobiose à liaison (I →6), 1,0 g de cellobiose à liaison (I →4), 0,5 g de laminaribiose à liaison (I →3), un peu moins de 0,1 g de sophorose à liaison (I →2) et 0,1 g de β - β -tréhalose à liaison (1→←1). Le β tréhalose est l'isomère de l' α tréhalose, mais les deux molécules de glucopyranose sont sous forme β dans le β tréhalose.

Il ne doit pas exister de grande différence de ΔF° entre l' α et le β tréhalose.

Les rendements obtenus par PEAT, WHELAN et HINSON sont d'autant plus importants que la synthèse du disaccharide a nécessité une moindre quantité d'énergie. De plus, l'action transférante de l'enzyme peut avoir réalisé des transosylations avec formation de liaisons moins riches en énergie. On peut fort bien admettre que du cellobiose synthétisé par l'enzyme s'est comporté comme donateur et, avec du glucose accepteur, a conduit au gentiobiose.

Une réaction de ce type est très courante dans le cadre des α ~~galact~~ glucosidases : le maltose (I →4) donateur conduit avec le glucose accepteur à l'isomaltose (I →6).

Si l'on se base sur les rendements en disaccharides, ils se classent ainsi par ordre de richesse croissante en énergie dans la liaison osidique :
gentiobiose - cellobiose - laminaribiose et enfin β tréhalose et sophorose. Le β tréhalose paraît bien être plus riche en énergie que le cellobiose et surtout que le gentiobiose.

PEAT, WHELAN et HINSON (91) ont obtenu des résultats similaires avec une préparation d'Aspergillus niger contenant des α et β glucosidases.

Cette préparation, réagissant sur une solution concentrée de glucose, synthétise des disaccharides. Le gentiobiose, le cellobiose et le laminaribiose furent les β glucosides isolés et identifiés.

De son côté, l'α glucosidase synthétisa divers disaccharides qui furent isolés et identifiés : isomaltose (I → 6) - maltose (I → 4) - nigerose (I → 3) et aussi l'α-α tréhalose.

DAHLQVIST (42) n'a pu obtenir de tréhalose par action réversible de la tréhalase intestinale. Par contre, ZEBE et Mc SHAN (113) ont obtenu une action réversible de la tréhalase de la blatte réagissant sur une solution de glucose à 20 p.100.

En conclusion, la liaison osidique de l'α - α tréhalose apparaît être relativement riche en énergie ; le tréhalose ne se différencie pas au point de vue thermodynamique des autres oligosaccharides donateurs. En principe, rien ne paraît s'opposer sur le plan thermodynamique à ce que le tréhalose intervienne comme donateur d'α glucopyranose.

2) STRUCTURE SYMETRIQUE DE LA MOLECULE

DAHLQVIST (42) a envisagé cette hypothèse de la façon suivante : "(les glycosidases agissent généralement sur leurs substrats de façon asymétrique, en ce sens qu'ils sont plus fortement liés à la partie glycone (le résidu osyl) de leurs substrats qu'à la partie aglycone. Ceci apparaît par leur plus grande spécificité pour la glycone et par les phénomènes de transosylations. Ceci est particulièrement apparent dans le cas des invertases.

Dans le saccharose soit la fraction glucosyl, soit la fraction fructosyl peuvent être considérées comme glycone et aglycone. En conséquence il y a deux sortes d'invertases dénommées glucosido- et fructosido - invertases, ces enzymes agissent respectivement sur les β D-fructofuranoses, et sont douées d'activité soit de transglucosylase, soit de transfructosylase.

La tréhalase intestinale du Porc, d'autre part, n'a pas

d'activité de transglucosylase. Par ailleurs elle ne paraît pas être capable d'hydrolyser aucun autre α D glucopyranoside que l'α-tréhalose. Les faits rendent probable que la tréhalase intestinale du Porc a une façon plus symetrique d'attaquer son substrat que ne l'ont les autres glucidases. Cette propriété est probablement commune à beaucoup de tréhalases différentes, parce que les tréhalases de nombreuses sources distinctes paraissent avoir une spécificité marquée pour leur substrat").

Nous n'avons observe aucun fait susceptible d'infirmer les considérations de DAHLQVIST. Nous sommes à même de confirmer ses dernières phrases puisque nous avons vérifié expérimentalement que trois tréhalases d'origines très différentes de celle de la muqueuse du Porc sont également dépourvues d'action transférante.

La question de symétrie de la molécule nous a conduit à faire un rapprochement avec des résultats obtenus dans le domaine des phosphatases.

Dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris ANAGNOSTOPOULOS, COURTOIS et SERVANT (4) avaient observé que certaines phosphatases végétales présentaient une action transférante marquée du radical orthophosphoryl. C'est ainsi que les phosphatases d'Orange et de Pomme transfèrent aisément du phénylphosphate donateur sur divers alcools accepteurs.

Le méthanol est un excellent accepteur et il se forme avec un bon rendement le monoester orthophosphorique du méthanol selon la réaction phényl-phosphate + méthanol $\xrightarrow[\text{Phosphatase}]{}$ phénol + méthylphosphate.

L'activité phosphotransférasique varie selon l'origine des enzymes, les phosphatases des sucs d'Orange et de Pomme, celle des feuilles de Belladone ont une action transférante marquée. Par contre ANAGNOSTOPOULOS et Coll. (4) n'ont décelé que de faibles transferts avec l'enzyme des graines de Moutarde blanche.

La faible action transférante de la phosphatase de Moutarde

résulte d'un écart peu accentué entre les vitesses d'hydrolyse du donateur et de l'ester synthétisé avec l'accepteur. De plus la phosphatase de Moutarde est très sensible à l'inhibition par de fortes concentrations en accepteur dans le milieu.

Ce n'est pas à la phosphatase de Moutarde que nous pouvons comparer les tréhalases. La tréhalase est au contraire peu sensible à l'inhibition par de fortes concentrations de substrat, DAHLQVIST (42) l'a observé et nous l'avons retrouvé lors de la détermination de la constante de Michaelis des trois tréhalases que nous avons étudiées.

Ce sont ces recherches ultérieures sur les phosphatases qui ont apporté des éléments de comparaison avec la tréhalase. ANAGNOSTOPOULOS et LINO (5) ont cherché à delimiter quelles étaient les phosphatases de graines douees d'une activité de phosphotransférase.

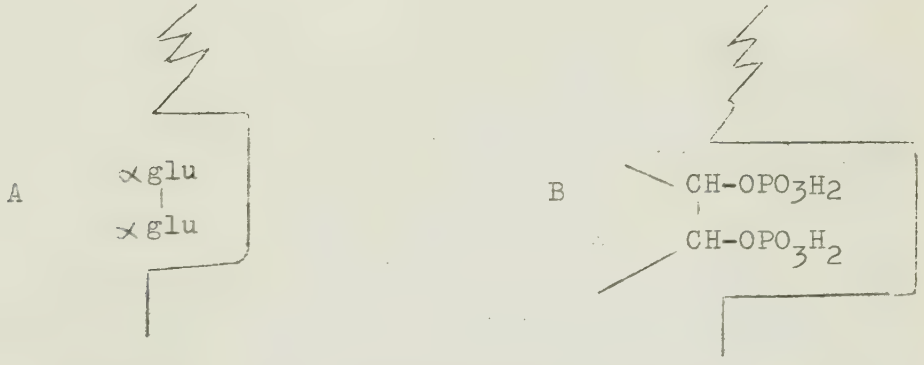
Ils ont constaté que les préparations possédant une forte activité de phosphotransférase sont en général des préparations n'ayant qu'une action minime ou nulle sur l'acide phytique. Les activités de phosphotransférase et de phytase appartiennent à deux enzymes distincts. Les rapports entre ces deux enzymes sont susceptibles de varier au cours du développement de la plante. ANAGNOSTOPOULOS et LINO (6) ont observé qu'au cours de la germination du Blé, il y a augmentation considerable de l'activité de phosphotransférase dans les tissus en croissance : tigelle et radicules. L'activité de phytase augmente également, mais elle est absente de ces tissus et demeure localisée dans le restant de la graine : cotylédon, albumen et téguments.

Dans une même classe d'hydrolases il existe donc des enzymes doués d'action transférante comme les phosphomonoestéràses, et d'autres qui sont souvent dépourvus d'action transférante comme la phytase. C'est déjà un premier point d'analogie avec le problème de la tréhalase qui n'occupe d'ailleurs pas une position tellement isolée parmi les α glucosidases.

En effet les α et β amylases, agissant elles aussi sur des liaisons α glucosidiques, sont dépourvues d'action transférante MANNERS (86), DEDONDER (49).

Un second fait à déduire des recherches d'ANAGNOSTOPOULOS et LINO nous paraît être particulièrement intéressant. Il s'est avéré que l'acide phytique n'a jamais fonctionné comme donateur du groupement orthophosphoryl quelle que soit la préparation phosphatasique employée par ANAGNOSTOPOULOS et LINO (5) (6).

L'acide phytique est l'ester hexaphosphorique du mésoinositol, sa molécule conserve l'asymétrie de l'inositol ; cependant si nous le considérons sous un aspect partiel, il a une certaine symétrie. Les liaisons ester phosphorique à rompre sont contiguës, dans chaque tiers de sa molécule nous avons par exemple -C H- ($O PO_3H_2$) - CH (OPO_3H_2). Si dans le centre actif de la phytase pénètrent deux liaisons contiguës nous trouvons quelque chose de très similaire à la symétrie de la molécule de tréhalose dans le centre actif de la tréhalase comme l'indiquent les deux schémas A et B.



S'agit-il d'une simple coïncidence entre l'absence des propriétés de donateur du tréhalose et de l'acide phytique ? S'agit-il au contraire d'une propriété commune due à la symétrie de la molécule ? Nous ne pouvons conclure, mais d'autres faits basés sur la constante de Michaelis permettent de trouver de nouvelles

analogies entre la tréhalase et la phytase.

3) HYPOTHESES SUR LA CONFIGURATION DU GROUPE ACTIF DE LA TREHALASE

Nous avons indiqué au début de cette discussion que la constante de Michaelis K_m indiquait que la combinaison tréhalose - tréhalase était très peu dissociée. En raisonnant en sens inverse, la tréhalase a une forte affinité K_M ($K_M = \frac{I}{K_m}$) pour le tréhalose.

L'acide pyrophosphorique H_2O_3 -P-O-P-O_3 H_2 est également une molécule symétrique susceptible d'être rompue par des hydrolases spécifiques : les pyrophosphatases.

Précisément la pyrophosphatase a une forte affinité pour le pyrophosphate. Dès 1937, FLEURY et COURTOIS (58) signalaient que dans la takadiastase d'Aspergillus orizae et l'émulsine d'amandes, l'affinité K_M était beaucoup plus élevée pour le pyrophosphate que pour le glycérophosphate, ce dernier substrat étant hydrolysé par les phosphomonoestérases associées.

Depuis, de nombreux auteurs ont montré avec d'autres pyrophosphatases que l'affinité de ces enzymes pour les pyrophosphates était toujours élevée.

Et nous pouvons revenir à la phytase ; elle présente aussi une grande affinité pour l'acide phytique comme l'ont indiqué FLEURY et COURTOIS dès 1947 (59). COURTOIS et LINO (33) dans leur revue générale sur les phosphatases végétales étudient longuement ce problème de la stabilité de la combinaison acide phytique-phytase; cette combinaison est d'ailleurs une combinaison acide phytique-protéine et BARRE a montré que ces combinaisons étaient très stables et peu dissociées en milieu faiblement acide.

Ainsi trois enzymes agissant sur des molécules symétriques ou des fractions symétriques de molécules donnent avec leurs substrats des combinaisons très peu dissociées. Nous manquons d'informations pour pousser plus avant les comparaisons.

En terminant cette discussion, nous voudrions pouvoir dégager quelques notions sur le mode d'action des glucidases.

COURTOIS et LECLERC (32) ont proposé de représenter ainsi les diverses étapes de l'action transferante de la β glucosidase, schéma extensible aux autres enzymes réalisant des transosylations à partir des oligo-saccharides et des hetérosides.

I) Le premier stade est la combinaison entre l'enzyme E et l'oside G - X

$$E + G - X \rightleftharpoons E\ G - X$$

La combinaison est dissociable, la constante de dissociation est la constante de Michaelis K_m

2) La combinaison activée par l'enzyme reagit sur des accepteurs hydroxylés HO - R
Deux cas sont à considérer :

a) R est H, l'accepteur est l'eau ; c'est la réaction classique d'hydrolyse

$$E.\ G - X + HO - H \longrightarrow E + G.\ OH + XH$$

G.OH est l'ose libéré, XH l'aglycone de l'oside. Dans le cas de la tréhalase X est aussi le glucosyl, et XH est une seconde molécule de glucose.

b) R est un radical organique : alcool, ose, oligosaccharide et l'on a une transosylation.

$$E.G - X + HO-R \longrightarrow E + XH + G-O-R$$

G.O - R étant le nouvel oside synthétisé.
La réaction a est la seule qui se produise avec la tréhalase, nous n'avons pu observer b avec les accepteurs usuels.

Le fait que E. G - X est très peu dissocié dans le cas de la tréhalase correspond à une structure particulière du groupe actif. Ce groupe ayant un caractère hydrophile marqué, oriente ainsi la réaction dans le sens a. Ceci demeure encore conjectural.

FEINGOLD (54) a procédé à une analyse très serrée des transferts du radical fructosyl en fonction de la structure du centre actif de l'enzyme. Il a émis l'hypothèse que l'action des fructosidases était orientée par la structure des centres actifs.

Selon cette structure l'enzyme a, soit une action transférante sur de grosses molecules comme la lévane sucrase, soit une action transférante sur de petites molécules ou sur l'eau comme l'invertine de levure.

Nous avons encore trop peu d'informations sur les tréhalases pour chercher à leur étendre l'interprétation de FEINGOLD. Il sera peut-être possible plus tard de proposer un schéma de modèles d'enzyme-substrat pour la tréhalase comme l'a fait FEINGOLD pour enzyme-saccharose.

Nous nous bornerons au terme de cette discussion à indiquer les principaux faits qui nous paraissent se dégager.

I) l'inaptitude de la tréhalase à transférer la différencie nettement des autres glucidases réalisant des transosylations à partir d'oligosaccharides donateurs.

2) Cette inaptitude ne correspond pas à une insuffisance d'énergie de la liaison osidique du tréhalose.

3) Cette inaptitude s'accompagne d'une faible dissociation de la combinaison tréhalase-tréhalose.

4) Des molécules symétriques comme le pyrophosphate ou le phytate donnent des combinaisons enzyme-substrat peu dissociées.

5) La symétrie de la molécule de tréhalose paraît bien être en relation avec l'inaptitude du tréhalose à fonctionner comme donateur.

6) Le groupe actif de la tréhalase se comporte comme s'il avait un caractère hydrophile orientant le clivage du lien osidique vers une réaction d'hydrolyse.

CHAPITRE VI

ETUDE DES GLUCIDASES DU HANNETON

-:-

INTRODUCTION - Nous avons utilisé dans le chapître précédent le Hanneton comme source de tréhalase. Nous désirions en effet étudier une tréhalase des insectes, notre choix s'était porté sur le Hanneton car cet insecte est facile à récolter en quantités relativement abondantes au printemps en Ile de France. Cette récolte est réalisable sans risques de confusion par des biochimistes aux connaissances entomologiques moyennement étendues.

Ayant décelé une tréhalase trés active dans le Hanneton, nous avons envisagé de rechercher quelle était son activité par rapport à celles des autres glucidases associées. Ces essais préliminaires se sont étendus par la suite aprés que nous eûmes décelé plusieurs osidases assez actives dans le Hanneton. Nous avons étudié un plus grand nombre de substrats à la demande du Professeur J.E. COURTOIS et de Monsieur C. CHARARAS, Maître de Recherches au C.N.R.S.

COURTOIS, CHARARAS, Mme DEBRIS et Melle HUBE étudient actuellement les possibilités d'assimilation des glucides par les insectes xylophages.

Leurs recherches sur l'Ips typographus (Coléoptère) ont déjà fait l'objet d'une publication. Nos essais ont été réalisés selon le même protocole et avec les mêmes substrats. COURTOIS et coll. désiraient en effet connaître l'équipement en glucidases d'un insecte non xylophage.

Ils ont eu l'obligeance de nous communiquer leurs résultats, encore inédits, obtenus avec d'autres insectes xylophafes : larves

d'Ips, larves et insectes matures de Pissodes notatus, larves de Longicorne.

Nous ferons donc état de ces données dans la discussion des résultats.

I) MATERIEL ET TECHNIQUES

a) Préparation de l'enzyme

50 g. d'insectes sont broyés au mixer dans I50 ml de solution ClNa à 8 p. I000. L'homogénéisat est centrifugé dans un appareil réfrigéré; le liquide surnageant est soumis à une dialyse de 24 heures à la chambre froide contre une solution de chlorure de sodium à 8 p. I000. La préparation enzymatique est congelée et conservée à - 20°.

b) Protocole opératoire

Nous avons effectué la plupart des essais à pH 5,2 et ceux avec le tréhalose et le saccharose comme substrats à pH 6,5. Lorsque le substrat n'a pas été hydrolysé, nous avons procédé à quelques essais complémentaires à d'autres pH. Tous les essais ont été réalisés à 37°C.

c) Pouvoir réducteur

Les oses libérés sont dosés par le réactif cupro-alcalin en utilisant la microméthode de NELSON-SOMOGYI (p.17). Dans le cas où il a été nécessaire de faire une défécation préalable, nous avons utilisé le protocole de COURTOIS et POISSON (37). La défécation s'effectue par l'acide tungstique qui sera neutralisé ensuite par le carbonate monopotassique en léger excés.

Dans le cas des oligosaccharides et des polysaccharides, le pourcentage d'hydrolyse enzymatique est calculé par rapport au pouvoir réducteur aprés hydrolyse chimique : SO_4H_2 4,5 N dans le milieu, 24 heures à l'étuve à I00° dans des ampoules scellées. Les pouvoirs réducteurs vis-à-vis du réactif cupro-alcalin sont exprimés en glucose pour les hydrolysats enzymatiques et chimiques.

II) HYDROLYSE DE DIVERS OLIGOSACCHARIDES ET HERÉROSIDES PAR L'ENZYME DU HANNETON

Le protocole opératoire est le suivant :

0,5 ml de préparation enzymatique correspondant à 166 mg d'insectes sont mis en contact une heure et 24 heures à 37°C, avec 2 ml de substrat M/40, puis 0,5 ml de tempon acide citrique-phosphate disodique de pH 5,2, 6 ou 6,5 Mc ILVAINE et 2 ml d'eau distillée.

Les résultats sont présentés comparativement avec ceux obtenus par COURTOIS et coll (31) dans le cas des osidases de l'Ips typographus.(Tableau n° VII)

TABLEAU n° VII

Hydrolyse de divers oligosaccharides et hétérosides par l'enzyme du Hanneton

(Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage d'hydrolyse du substrat)

Substrat	pH	I h. Hanneton	24 h. Hanneton	24 h. Ips typographus COURTOIS, CHARARAS, DEBRIS (3I)
Saccharose	6	6	27	I00
α phényl-glucoside	5,2	5	33	infime
Maltose	6,5	4	30	40
α - α - tréhalose	6,5	25	I00	I00
β -phényl-glucoside	5,2	9	77	50
α - phényl-galactoside	5,2	7	32	66
Raffinose	5,2	8	20	77
β- phényl-galactoside	5,2	I8	50	72
Lactose	5,2	2	I4	27
α - phényl-mannoside	5,2	9,6	7I	non déterminé
β - phényl-mannoside	5,2	7	3I	nom déterminé

DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES OLIGOSACCHARIDES ET HETEROSIDES.

Nous allons examiner successivement chacune des osidases.

I) Invertase -

L'action sur le saccharose est assez peu marquée, la courbe d'activité en fonction du pH (figure IO) indique deux optima, l'un peu saillant à pH 2,5, l'autre net et caractéristique à pH 6,0.

(Voir Fig. IO page suivante)

En vue de savoir su le saccharose était scindé par une glucosido-invertase ou une fructosido-invertase, nous avons recherché lequel des deux hexoses était transféré du saccharose donateur sur le méthanol accepteur.

Une série d'essais furent réalisés avec 0,5 ml de préparation enzymatique et 5 ml de mélange réactionnel final tamponné à pH 6,0.

Les concentrations de saccharose furent M/20 et M/IO dans le milieu.

Pour chacune de ces concentrations en saccharose, nous opérons soit sans addition de méthanol, soit avec des concentrations en méthanol M - 2M et 5M dans le milieu.

Nous laissons en contact à 37° et procédons à des développements chromatographiques sur des prélèvements effectués aprés I, 3, 6 et 24 heures de contact. Les chromatogrammes sont révélés par le révélateur au tétracétate de plomb pour le méthyl-α- glucoside et par le révélateur à la β-naphtylamine pour le méthyl-β-fructoside, car les fructosides donnent facilement par chauffage avec les acides étendus des dérivés furfuraliques.

Les résultats obtenus sont les suivants :

I) Aprés I heure et 3 heures de contact, il apparaît de

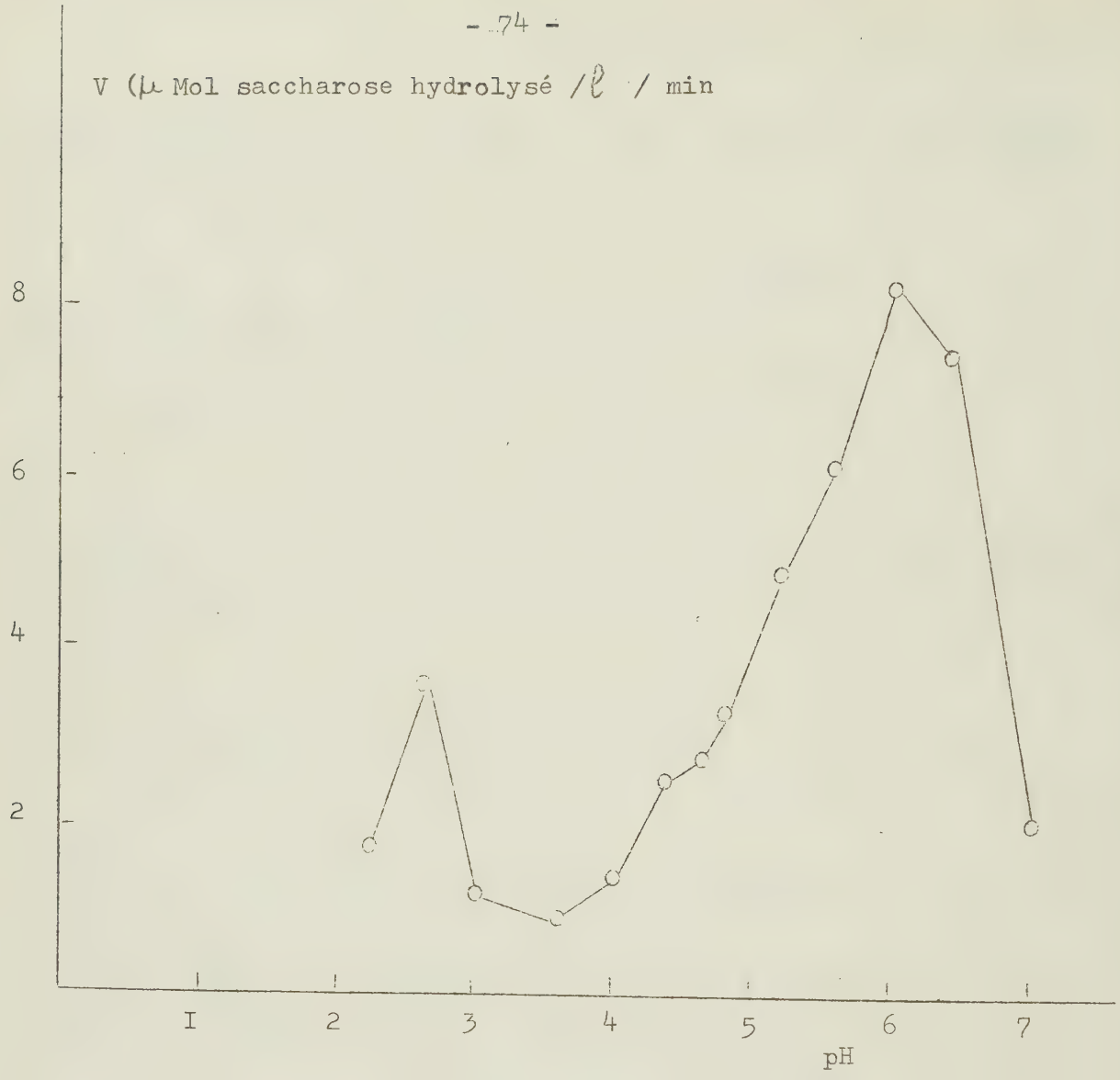


Fig. IO : Courbe d'activité en fonction du pH de l'invertase du Hanneton.

petites quantités de glucose et de fructose en présence du méthanol, nous n'avons pas décelé d'autres glucides.

2) Après 6 heures, en présence comme en l'absence du méthanol, il se forme des oligosaccharides migrant plus lentement que le saccharose; ce sont vraisemblablement des fructosido-saccharoses. En présence du méthanol, environ I5 p. IOO du glucose et du fructose du saccharose sont libérés.

Il apparaît en outre un corps ayant la même mobilité que le méthyl β-fructoside témoin (I). C'est avec une concentration M/20 en saccharose et 2 M en méthanol que la proportion de méthyl- β -fructoside est la plus importante.

3) Après 6 heures, la proportion de fructoside augmente et atteint son maximum après 24 heures.

Tout semble donc indiquer que le Hanneton renferme une fructosido-invertase capable de transférer la fraction β-fructofuranosyl du saccharose sur le méthanol.

Avec le saccharose M/20 et le méthanol 2M nous avons réussi à déceler aprés 24 heures de contact une trés faible tache ayant la mobilité du méthyl- α -glucoside. La quantité formée est au moins dix fois plus faible que celle du méthyl- β -fructoside. TAKANO (IOI) a mis en contact un extrait de petit intestin de Porc avec du saccharose et du méthanol, il n'a pu déceler de transfert de glucose ou de fructose sur le méthanol; par contre le saccharose se comporte comme donateur et comme accepteur du groupement fructofuranosyl et il se forme un trisaccharide qui est un mono-fructosidosaccharose. TAKANO en déduit

---

(I) Nous remercions M. TO DONG qui nous a fourni ce corps qu'il avait préparé par transfert à l'aide de la fructosidase de levure : saccharose donateur et méthanol accepteur.

que l'intestin de Porc renferme une fructosido-invertase que dans ses conditions opératoires, n'a pas transféré sur le méthanol.

Il apparaît donc que l'invertase du Hanneton est principalement une fructosido-invertase.

Elle est douée d'action transférante, ce qui prouve que dans le Hanneton il existe au moins un enzyme à action transosylante, associé à la tréhalase dépourvue d'une telle action.

L'invertase du Hanneton se différencie ainsi de celle de l'Ips qui est une glucosido-invertase.

Une petite quantité de glucosido-invertase associée est décelable dans le Hanneton comme COURTOIS et coll. avaient décelé dans l'Ips une très légère action de fructosido-invertase.

Par ailleurs, la fructosido-invertase du Hanneton a un pH optimum de 6,0 alors que la glucosido-invertase de l'Ips présentait un pH optimum de 4,8.

L'invertase du Hanneton est beaucoup moins active que celle de l'Ips adulte. 0,5 ml de préparation correspondant à 0g I66 d'insecte hydrolysent 6 p. I00 du saccharose en 60 minutes. Avec la même concentration de saccharose mais à pH 5, 0, 0,5 ml de préparation correspondant à 0g I25 d'insecte hydrolysent en 30 minutes 50 p. I00 du saccharose avec l'Ips mature récolté en Juin, mais l'Ips récolté en Avril à la fin de l'hibernation n'en hydrolyse que I4,5 p. I00 et la larve d'Ips I0,5 p. I00.

Avec un extrait correspondant à 0g I25 d'insecte, COURTOIS - CHARARAS et Mme DEBRIS n'ont obtenu que 4 p. I00 d'hydrolyse avec le Pissodes notatus, 2 p. I00 avec les larves de Pissodes et I4,0 p. I00 avec les larves de Longicorne.

L'activité invertasique de l'Ips est donc trés marquée; celle du Hanneton n'a rien d'anormalement faible car elle est du même ordre de grandeur que l'activité de l'invertase du Pissodes, dont il n'a pas encore été précisé s'il s'agissait d'une glucosido- ou d'une fructosido-invertase.

2) α -glucosidases -

Nous ne nous étendrons pas sur la tréhalase déjà étudiée dans les chapîtres précédents. A titre de comparaison avec les autres enzymes, nous avons signalé dans le Tableau I que le Hanneton hydrolyse 25 p. I00 du tréhalose en 60 minutes et I00 p. I0. en 24 heures. Parmi les glucidases du Tableau I c'est la tréhalase qui se montre la plus active.

La tréhalase est également fort active dans les insectes xylophages. En 24 heures, les pourcentages d'hydrolyse sont de I00 avec l'Ips de Juin, 70,5 pour celui correspondant à la fin de l'hibernation, 80 avec les larves d'Ips, 62 pour le Pissodes adulte et 60 pour ses larves, enfin 87,5 avec les larves de Longicorne.

Pour tous ces insectes, la tréhalase s'est révélée susceptible d'hydrolyser un plus fort pourcentage de tréhalose que les autres glucidases agissant sur leurs substrats respectifs : oligosaccharides ou hétérosides.

Il se confirme donc que la tréhalase est l'une des glucidases les plus actives sinon la plus active chez les insectes.

Comme autres α -glucosidases le Hanneton a hydrolysé de façon moyenne la maltose : 4 p. I00 en I heure et 30 p. I00 en 24 heures. Dans les mêmes conditions, l' α - méthylglucoside ne permet pas d'observer la moindre hydrolyse.

Ce fait nous confirme que s'il s'était formé de l' α -méthylglucoside avec le tréhalose donateur et le méthanol accepteur, le corps ainsi synthétisé n'aurait pas été hydrolysé et nous aurions pu déceler une action transosylante de la tréhalase si elle s'était manifestée chez le Hanneton.

Enfin, le Hanneton hydrolyse assez régulièrement l' α-phénylglucoside.

Dés I939, LEIBOWITZ et HESTRIN (83) avaient observé que la taka-diastase renfermait au moins deux α -glucosidases : l'une agis-

sant sur le maltose, l'autre sur le méthyl- α -glucoside. Au cours des dernières années, DAHLQVIST (4I) (43) a différencié les α -glucosidases associées dans l'intestin de Porc. Des préparations trés actives sur le maltose demeurent sans effet sur le méthyl- α -glucoside. De plus, DAHLQVIST (4I) a séparé une maltase active sur le saccharose et le maltose, mais sans effet sur l'isomaltose et le phényl- α -glucoside.

3) β -glucosidase

Le seul substrat étudié a été le β -phényl-glucoside; il est hydrolysé assez rapidement par le Hanneton.

La présence d'une β -glucosidase dans le Hanneton est intéressante; il est en effet admis que les produits toxiques sont éliminés en partie par les insectes à l'état de β -glucosides.

Ce serait une conjugaison avec le β -glucose qui remplacerait la conjugaison avec l'acide β -glucuronique jouant un rôle physiologique similaire chez les Mammifères.

4) α -galactosidase

KOIKE (79) a signalé la présence d' α -galactosidase chez les Insectes. COURTOIS et coll. (3I) ont décelé une α -galactosidase assez active chez l'Ips, son pH optimum est de 5,2.

Le Hanneton renferme une α -galactosidase hydrolysant aisément l' α -phénylgalactoside I8 p. IOO en I h. et 50 p. IOO en 2I heures. Nous avons déterminé la courbe d'activité en fonction du pH de cet enzyme (figure II).

(Voir Fig. II page suivante)

Nous n'avons décelé qu'un seul pH optimum situé vers 6,0.

Le tableau VII montre que le raffinose est hydrolysé de façon moyenne par le Hanneton; la chromatographie sur papier nous a permis de déceler, après action de l'enzyme, du glucose, du fructose et du galactose; il y a donc interventions successives de la fructosido-invertase et de l' α -galactosidase.

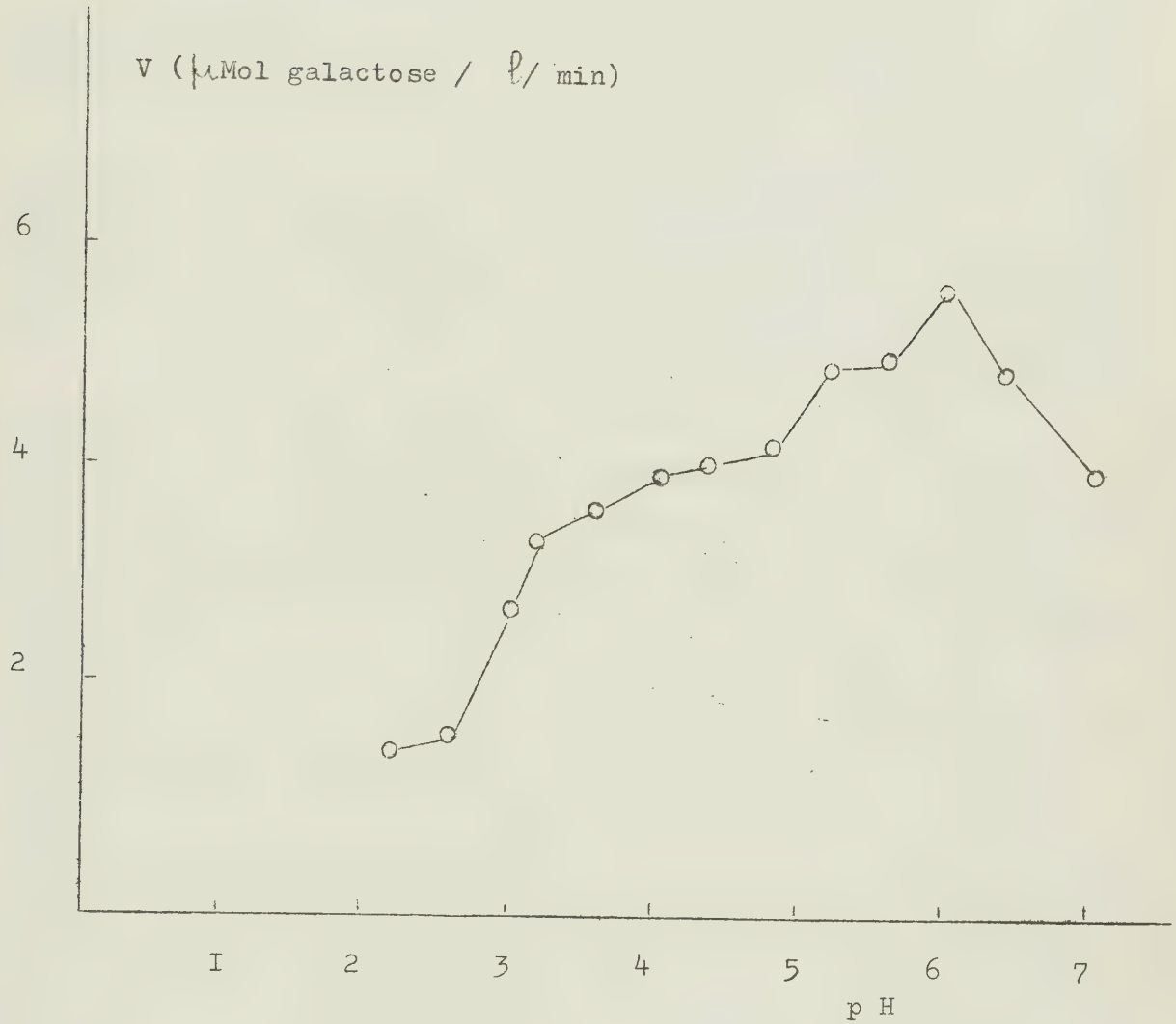


Fig. II : Courbe d'activité en fonction du pH de l'α-galactosidase du Hanneton.

5) β-galactosidase -

Le Hanneton renferme une ou deux β galactosidases qui hydrolysent lentement le lactose et plus rapidement le β phényl-galactoside.

6) Mannosidases -

Nous avons également décelé une α et une β mannosidase dans le Hanneton; l'α - mannosidase hydrolyse plus rapidement l'α - phénylmannoside que ne le fait la β -mannosidase pour le β -phényl-mannoside.

Ainsi, dans l'ensemble, le Hanneton possède un éventail assez large de glucidases agissant sur les hétérosides et les oligosaccharides. Tous les osides utilisés comme substrats à l'exception de l'α -méthyl-glucoside ont en effet été hydrolysés plus ou moins rapidement.

TABLEAU n° VIII

Hydrolyse à pH 5,2 de divers polysaccharides par la préparation enzymatique du Hanneton *

Substrat	Hanneton 4 jours	Ips typographus COURTOIS, CHARARAS, DEBRIS (3I) I jour	5 jours
Amidon	90	62	-
Coton	2,2	0	-
Cellophane	0	0	-
Carboxyméthyl cellulose	20,8	0	-
Glucomannane	5	65(I5h)	-
Galactomannane	5	I2	-
Glucusono-araboxylane 4 bis	2,8	6	24
Glucuronoxylane DA	2,2	6	-
Hémicellulose B 7	II,3	65	87
Hémicellulose CI	I8,5	I8	68
Pectine	I0	-	76
Gomme arabique	0	0	0

* Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage du pouvoir réducteur sur le réactif cupro-alcalin, pourcentage calculé d'aprés le pouvoir réducteur de l'hydrolysat acide total considéré comme égal à I00.

III) ACTION DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DU HANNETON SUR DIVERS POLYSACCHARIDES.

Nos essais ont été réalisés en utilisant comme substrats quelques représentants des principaux types de polysaccharides végétaux.

Les résultats figurent dans le tableau VIII, nous avons groupé dans la dernière colonne à droite les données de COURTOIS, CHARARAS et DEBRIS (3I) ayant utilisé les mêmes substrats soumis à l'action d'Ips typographus.

A) GLUCANES

I) Amidon - Nous avons fait réagir 0,5 ml de préparation enzymatique sur 2 ml d'empois d'amidon de fécule M/40 en anhydroglucose. Aprés 24 heures à 37°, l'enzyme libère 90 p. I00 de glucose à pH 5,2. L'hydrolyse a été appréciée d'aprés le pouvoir réducteur exprimé en glucose. La présence d'une maltase associée n'a pas permis d'étudier de façon plus détaillée la marche de l'amylolyse.

Le Hanneton contient une amylase assez active, ce qui ne parait pas être caractéristique de ce seul insecte. En 4 jours, l'extrait correspondant à 0 g I66 de Hanneton a libéré 90 p. I00 des groupes réducteurs associés dans l'amidon.

Mais en un jour avec un extrait correspondant à 0g I25 d'insecte COURTOIS, CHARARAS, Mme DEBRIS et Melle HUBE ont obtenu les pourcentages suivants d'hydrolyse : Ips adulte 62, Ips en fin d'hibernation 98,5, larves d'Ips 74,5, Pissodes adulte 9I,5, larve de Pissodes 83,75, larves de Longicorne 83,0.

Il apparaît donc que tous les insectes étudiés ont des amylases fort actives.

2) Cellulose - Les essais furent réalisés à pH 5,2 avec 0,5 ml de préparation enzymatique opposé à dix mg de substrat. Il n'y a pas eu d'attaque de la cellophane, le coton Hydrophile a été attaqué d'une façon infime 2,2 p. I00 en 4 jours, par contre l'hydrolyse de la carboxyméthylcellulose est fort accentuée: 20,8 p. I00.

L'on tend maintenant à admettre qu'il existe plusieurs catégories d'enzymes agissant sur la cellulose. WHITAKER (I07) dans une revue sur les cellulases groupe un faisceau d'arguments en faveur de cette conception. De même que l'on a différencié diverses amylases et des maltases, il existerait aussi des cellulases attaquant de façon différente la molécule non dégradée de cellulose, d'autres poursuivant l'hydrolyse des cellodextrines et enfin des enzymes n'agissant que sur les oligosaccharides terminaux comme le cellobiose, le cellotriose et le cellotétraose.

HALLIWELL (65) distingue l'action de la cellulase agissant sur le coton de celle de la carboxyméthylcellulase hydrolysant la carboxyméthyl-cellulose.

Le Hanneton renfermerait donc de la carboxyméthymcellulase mais ne posséderait qu'une cellulase d'activité négligeable. Parmi les Insectes xylophages étudiés par COURTOIS, CHARARAS et coll. seul Pissodes notatus adulte a manifesté une activité hydrolysante notable sur le coton et la cellophane.

B) GLUCOMANNANES ET GALACTOMANNANES

I) Glucomannane - M. DALLOUL nous a procuré un échantillon de glucomannane extraite des bulbes d'Orchidées (Salep de Syrie). Ce polysaccharide purifié a un rapport moléculaire mannose/glucose voisin de 3. En 4 jours à pH 5,2, 0,5 ml de préparation enzymatique du Hanneton réagissant sur 0,05 de glucomannane n'en a libéré que 5 p. I00 des oses réducteurs combinés. Cette hydrolyse est insignifiante surtout si l'on compare à l'Ips qui en I5 heures avait libéré 65 p. I00 des oses associés.

2) Galactomannane - La galactomannane de Luzerne a été obtenue selon la technique décrite par COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et PETEK (29). 0,5 ml de préparation enzymatique réagissant sur 2 ml de substrat M/40 en anhydro-hexose en libérant en 4 jours à pH 5,2, 5 p. I00 des hexoses combinés. L'hydrolyse peut être rapportée à une

α-galactosidase du Hanneton. Les chromatogrammes du milieu d'hydrolyse montrent qu'il y a une faible libération de galactose.

L'Ips adulte et les larves d'Ips attaquent de façon plus accentuée la galactomannane de Luzerne; Pissodes notatus adulte provoque la libération de 2I p. IOO des oses réducteurs en 5 jours alors que les larves de Pissodes demeurent sans action et celles de Longicorne provoquent une hydrolyse insignifiante.

C) GLUCURONOARABOXYLANES ET GLUCURONOXYLANES

Nous avons utilisé des polysaccharides obligeamment procurés par Mr. A. ROUDIER (7), que nous sommes heureux de remercier.

I) La xylane 4 bis de ROUDIER (93) (95) est extraite par la soude de la paille de blé précipitée par l'éthanol, elle est purifiée par redissolution dans la soude. C'est un polysaccharide d'un degré de polymérisation moyen de IO7. Il est formé par une chaîne centrale d'unités β xylopyranosyl reliés en (I → 4); sur cette chaîne se greffent 3 ou 4 unités de L arabofuranose (probablement α) reliés également en (I → 3) au xylose, et I ou 2 unités d'acides α -pyranosyluroniques reliées également en (I → 3) au xylose.

0,5 ml d'enzyme réagissant sur I8 mg de substrat libèrent en 4 jours à pH 5,2 - 2,8 p. IOO des groupes réducteurs combinés. C'est donc une hydrolyse insignifiante.

2) La xylane D A de ROUDIER (93) (95) diffère de la précédente par le fait que l'arabinose a été éliminé par hydrolyse modérée avant l'extraction. La pâte à papier de paille de blé est chauffée 5 heures à IOO° avec une solution d'acide oxalique à 2,25 g p. IOOO. Le polysaccharide est ensuite extrait par la soude. Le corps obtenu est une glucuronoxylane dépourvue d'arabinose; elle contient une mol. d'acide glucuronique.

Aprés 4 jours à pH 5,2 0,5 ml de préparation enzymatique libérent 2,2 p. IOO des groupements réducteurs contenus dans les I8 mg de substrat.

Les deux xylanes se sont comportées d'une façon similaire vis-à-vis des enzymes du Hanneton.

L'hydrolyse est bien moins accentuée que celles obtenues avec les insectes xylophages.

D) HEMICELLULOSES PLUS COMPLEXES

Nous avons utilisé comme substrats deux fractions hémicellulosiques plus complexes de bois de Conifères procurées par A.ROUDIER.

I) La fraction B 7 a été extraite par la soude à I2 p.I00 d'une holocellulose au chlorite de Pin maritime ROUDIER (94). Ce produit libère par hydrolyse 2,3 p. I00 d'arabinose, 8 p. I00 de xylose, 27 à 40 p. I00 de mannose, 5,7 p. I00 de glucose, 3,7 p. I00 de galactose et 3,9 p. I00 d'acides aldo-uroniques. Selon ROUDIER, le mélange contient environ 20 p. I00 d'une glucuronoaraboxylane, 45 p. I00 d'une glucomannane et 4 à 5 p. I00 d'une glucuronoaragalactane.

Avec 8 mg de ce substrat et 0,5 ml d'enzyme, l'hydrolyse est en 4 jours à pH 5,2 de II,3 p. I00 .

Il est difficile de tirer des conclusions nettes avec un substrat aussi complexe qui est faiblement attaqué.

2) La fraction C_1 a été extraite par la soude à 0,5 p. I00 d'une holocellulose au chlorite de Pin maritime. Elle renfermerait environ 25 p. I00 d'acide pectique sous forme de sel de sodium, 30 à 35 p. I00 de glucurono-araboxylanes, 7 à 8 p. I00 de glucomannanes et galactoglucomannanes et 22 à 23 p. I00 d'une glucuronoarabogalactane. 0,5 ml d'enzyme réagissant 4 jours à pH 5,2 sur 8 mg de polysaccharides en hydrolysent I8,5 p. I00 .

L'hydrolyse de I8,5 p. I00 est nette, c'est d'ailleurs l'hémicellulose la plus fortement hydrolysée par tous les insectes. Les insectes xylophages fournissent des pourcentages d'hydrolyse plus élevés que le Hanneton : 76 p. I00 avec les larves d'Ips, 5I,75 p.I00 avec les larves de Longicorne et 52,25 avec les larves de Pissodes.

Dans l'ensemble, tous ces insectes, y compris le Hanneton, contiennent des hémicellulases.

E) PECTINES ET GOMMES

Comme substrat, nous employons la préparation injectable Arhemapectine Gallier. I ml de cette solution renferme I5 mg de pectine. Elle libère par hydrolyse sulfurique de l'arabinose, du galactose, de l'acide galacturonique et une faible quantité de xylose.

I ml de préparation enzymatique est ajouté à I ml d'arhemapectine et du tampon de pH 5,2. La viscosité diminue progressivement et il apparaît un pouvoir réducteur. IO p. IOO des groupements réducteurs sont démasqués aprés 4 jours.

Le Hanneton a une action sur la pectine bien moins accentuée que les Insectes xylophages.

Les pourcentages des composés réducteurs libérés sont en effet aprés 5 jours de IOO p. IOO avec les larves et insectes matures de Pissodes comme avec les larves de Longicorne, 90 p.IOO avec les larves d'Ips et 76 p. IOO avec l'Ips adulte.

ROUDIER (95) a insisté sur l'analogie de structure entre la gomme arabique et les glucuronoarabogalactanes du bois. Les enzymes du Hanneton n'ont pas d'action sur la gomme arabique.

35 mg de gomme sont mis en contact avec 0,5 ml de préparation de Hanneton. Le faible pouvoir réducteur initial de la gomme n'est pas accru aprés I à 4 jours, que ce soit à pH 4,8 - 5,2 ou 5,6.

Cette absence d'action sur la gomme indique que le Hanneton ne possède pas d'enzyme attaquant les extrêmités non réductrices des branchements; il n'y a pas rupture de liaisons L α-arabinoside et L rhamnoside. La chaîne centrale d'unités β galactopyranosyl liées en (I $\rightarrow$ 3) n'est pas accessible aux β galactosidases du Hanneton, car toutes les unités galactose sont substituées en 6 par des galactoses eux-mêmes substitués en 3 par le rhamnose et en 6 par un acide arabi-

nosido-glucuronique.

Parmi les insectes xylophages étudiés, seules les larves d'Ips ont provoqué une légère hydrolyse de la gomme : II p. 100.

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS

Le Hanneton renferme des enzymes aptes à rompre des liaisons osidiques avec des substrats assez variés.

C'est la tréhalase qui paraît être la glucidase la plus active comme avec les insectes xylophages étudiés.

Les oligosaccharides et les hétérosides utilisés comme substrats ont montré que le Hanneton renfermait des enzymes actifs sur tous les corps étudiés : donc des α et β glucosidases, galactosidases et mannosidases.

Le Hanneton contient de plus des enzymes agissant sur des polysaccharides assez variés. Ces actions sont cependant plus diversifiées qu'avec les oligosaccharides. Le plus efficace de ces enzymes est l'amylase, la carboxyméthylcellulase a une nette activité mais la cellulose du coton est attaquée de façon infime.

Le Hanneton n'a attaqué que de feçon trés modérée la glucomannane, la galactomannane, les xylanes complexes, la pectine et est demeuré sans action sur la gomme arabique. Le Hanneton contient aussi des hémicellulases d'activité moyenne.

Si nous comparons le comportement du Hanneton à celui des insectes xylophages étudiés, nous ne notons pas de grandes différences dans l'intensité de l'action sur les oligosaccharides,sur les hérérosides.

Les insectes xylophates ont par contre une action plus efficace que le Hanneton sur les polysaccharides des parois cellulaires comme araboxylanes, hémicelluloses et pectines. Ceci ne saurait surprendre car le Hanneton se nourrit de feuilles bien moinsriches en ces polysaccharides que la partie périphérique du tronc des Conifères.

Le polysaccharide qui est attaqué le plus aisèment par le Hanneton est l'amidon, c'est précisèment celui qui se trouve à l'état d'amyloplastes à l'intérieur des cellules.

D'une façon sans doute beaucoup trop sommaire, il est permis de considérer que les Insectes xylophages peuvent attaquer aussi bien les glucides de la sève et du cambium que les polysaccharides des parois cellulaires. Le Hanneton de son côté attaque bien les oliogo-saccharides et l'amidon mais ne manifeste qu'une action minime sur les polysaccharides des parois cellulaires.

-:-

DEUXIEME PARTIE

-:-

ACTION TRANSFERANTE DE L'INVERTASE SUR RAFFINOSE

-:-

INTRODUCTION

L'activité transférante de l'invertase de levure a été mise en évidence simultanément en 1950 par BACON et EDELMAN (9) et par BLANCHARD et ALBON (17) : ces auteurs ont observé que l'hydrolyse du saccharose est accompagnée de l'apparition d'un certain nombre d'oligosaccharides.

De nombreuses recherches ultérieures ont montré que cette formation d'oligosaccharides résulte d'une réaction de transfert du radical β-D- fructofuranosyl d'un donateur (saccharose, raffinose, méthyl -β-D- fructofuranoside etc...) sur divers accepteurs.

Les alcools aliphatiques primaires, les oses et les osides peuvent servir d'accepteurs.

En présence du méthanol, BACON (10), WHELAN et JONES (106), ont observé la formation de méthyl -β-D-fructofuranoside.

Les transferts sur glucose et fructose sont confirmés par des expériences avec les sucres marqués (52). Avec le glucose, on obtient un sucre réducteur : Fruf (2 →6) Glup ; et avec le fructose deux disaccharides : Fruf (2 →1) Fruf, et Fruf (2 →6) Fruf (11) (15) (108).

Le mannose et le galactose agissent de la même manière que le glucose (106) ainsi que les polyalcools correspondant tels que le sorbitol et le mannitol.

Avec le saccharose accepteur, trois trisaccharides differents

sont formés par l'action transférante de l'invertase : (I) (64).

le Kestose ou 6- Kestose : β Fruf (2 → 6) Fruf (2 → ← I) α Glup
le I - Kestose : β Fruf (2 → I) Fruf (2 → ← I) α Glup
et le Néokestose : β Fruf (2 → 6) Glup (I → ← 2) β Fruf

BEALING a signalé que les préparations enzymatiques de moisissures : Penicillium spinulosum, A. niger, A. oryzal, A. flavus et Takadiastase sont capables d'hydrolyser le raffinose. Quand l'activité α -galactosidasique de ces préparations est négligeable, l'hydrolyse du raffinose en mélibiose et fructose est accompagnée de l'apparition d'un fructoside de Rf plus petit que celui du raffinose ; il apparaît en outre un deuxième oligosaccharide qui migre plus lentement que le premier. De plus, il y a formation d'un fructobiose réducteur.

Ce même auteur a montré que le stachyose, mis en incubation avec les extraits de P. spinulosum, A. oryzal, A. niger, et Takadiastase, libère lentement du fructose et du manninotriose. Ce dernier est hydrolysé en un mélange de glucose, galactose et mélibiose. En outre, une petite quantité d'un fructoside réducteur de Rf plus petit que celui du Stachyose a été observée : ce fructoside résulte probablement de l'activité transférante de l'invertase (14).

Ces recherches de transfert sur le raffinose et sur le stachyose ne sont que sommaires : les structures des fructosides formés, les fonctions auxquelles le radical β-D- fructofuranosyl serait transféré (sur les accepteurs possibles présents dans le milieu) ne sont pas précisées.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action transférante de l'invertase sur raffinose. Notre préparation enzymatique obtenue à partir de la levure de boulangerie est totalement dépourvue d'α -galactosidase et d'α glucosidase, ce qui facilite l'observation de l'action transférante provoquée par la seule β-fructosidase.

Nous avons pu séparer les sucres formés par transfert présen-

tant des Rf inférieurs à celui du raffinose, et les étudier par les hydrolyses enzymatiques et la méthylation.

Nous avons envisagé ensuite les groupements de raffinose servant d'accepteurs du radical β-fructofuranosyl.

-:-

MATERIEL ET TECHNIQUES

-:-

I) PREPARATION DES ENZYMES

a/ Invertase des levures

L'enzyme a été préparé à partir de la levure haute de panification, selon la méthode de SUMNER et SOMERS (100).

50 g de levures, 50 ml d'eau distillée et 20 ml de toluène sont agités mécaniquement pendant 24 heures, puis abandonnés 7 jours à la température du laboratoire. Le milieu est ensuite mélangé avec 20 g de célite, et filtré sur Büchner jusqu'à obtention d'un liquide clair. Nous lavons le filtre avec 20 ml d'eau distillée et réunissons les deux liquides.

Nous dialysons la solution ainsi obtenue pendant 48 heures à la chambre froide contre de l'eau distillée, puis nous la centrifugeons à 6.000 tours/minute.

Le liquide surnageant est utilise pour nos essais.

b/ Préparation enzymatique de Penicillium paxillus

Nous avons employé la méthode préconisée par COURTOIS, CARRERE et PETEK (30).

Nous ensemençons la souche de Penicillium paxillus sur milieu de Raulin contenant comme seul aliment glucidique 2 % de raffinose ; après 4 jours d'étuve à + 24° C, le mycélium est recueilli et essoré jusqu'à dessiccation partielle. 30 g du mycélium humide ainsi obtenus sont broyés à + 4°C. soit dans un mortier en présence de sable, soit directement dans un Turmix. Le broyage est réalisé en présence de 200 ml d'une solution de chlorure de sodium à 8 pour

1000 renfermant 1 mg par litre de cyanure de potassium. L'addition de cyanure inhibe les oxydases présentes qui communiqueraient une teinte marron à la solution.

La suspension est soumise à une centrifugation d'une heure (centrifugeuse réfrigérée tournant à 5.000 t/min.). Le liquide surnageant, soit 180 ml, est relargué à 0° par le sulfate d'ammonium à 70 p. 100 ; puis après repos de 24 heures à + 4°C, soumis à centrifugation. Le précipité collecté est repris par 25 ml d'eau ; la solution obtenue est dialysée contre de l'eau distillée.

Cette préparation possède à la fois une activité α -galactosidasique et une nette action hydrolysante sur le saccharose, le raffinose et ses homologues supérieurs.

c/ α -galactosidases des graines de Café

Nous avons préparé l' α -galactosidase des graines de Café selon la méthode preconisée par PETEK et TO DONG (92) : l'enzyme a été purifié par chromatographie sur colonne d'alumine suivie d'élution.

II) SYNTHESE PAR TRANSFERT ENZYMATIQUE DES FRUCTOSIDES DU RAFFINOSE

Des tâtonnements nous ont permis de préciser les conditions permettant d'obtenir une quantité importante de fructosides sans gêner leur isolement ulterieur.

Dans un tube à hémolyse sont introduits : 1,5 g de raffinose, 0,5 ml d'un tampon acide citrique-phosphate disodique de pH 5,2 , 0,5 ml d'invertase de levure et le volume de l'essai est complété à 5 ml avec l'eau distillée. Dans ce milieu, le raffinose est employé à la fois comme donateur et comme accepteur.

Le mélange est maintenu dans un thermostat à 37° pendant 2 heures et demie.

A la fin de cette période, l'action enzymatique est arrêtée

en portant rapidement le milieu réactionnel à 100° pendant 5 min.

La chromatographie sur papier révèle l'existence des glucides suivants : fructose, saccharose, mélibiose, raffinose et deux corps migrant plus lentement que le raffinose.

III) ISOLEMENT DES FRUCTOSIDES FORMES PAR TRANSFERT

A partir de 5 ml du milieu réactionnel précédent, nous avons effectué la séparation des fructosides du raffinose formés par transfert, des autres composés du mélange par chromatographie descendante sur papier Whatman n°3 avec le solvant I (p. 23). Nous avons employé pour cette opération huit papiers de dimensions 24 cm x 46 cm (largeur x longueur).

Après 7 jours de développement à 18°, nous desséchons les chromatogrammes, découpons les bandes horizontales correspondant à chacun des oligosaccharides, extrayons trois fois par l'eau froide.

La solution obtenue est concentrée sous vide. Les corps sont à nouveau purifiés dans les mêmes conditions par chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 2043 bM.

Les solutions contenant les oligosaccharides sont finalement évaporées à sec et conservées dans un dessiccateur en présence de chlorure de calcium.

En vue d'obtenir une quantité suffisante des fructosides formés par transfert pour les essais d'identification, nous avons répété l'opération précédente douze fois.

IV) IDENTIFICATION DES FRUCTOSIDES FORMES PAR TRANSFERT

Nous avons obtenu 175 mg d'un sucre de R_{Glu} = 0,20 (que nous appellerons par la suite corps A), et 60 mg d'un autre sucre de R_{Glu} = 0,29 (corps B) ; tous ces sucres migrent moins vite que le raffinose (R_{Glu} = 0,39) (R_{Glu} = mobilité par rapport au glucose sur le papier Schleicher et Schüll 2043 bM avec le solvant I). Le fait que la vitesse de migration du corps A est plus faible que

celle du raffinose, nous amène à penser qu'il s'agit probablement d'un tétrasaccharide. Le corps A n'est pas réducteur, tandis que le corps B réduit le réactif cupro-alcalin de Somogyi (99).

La faible quantité du corps B obtenue, ainsi que son caractère réducteur ne nous a pas permis d'étudier ce composé. Il s'agit probablement d'un produit de transfert du radical fructosyl sur mélibiose, ce dernier provenant de l'hydrolyse du raffinose.

Les résultats de l'identification du corps A sont les suivants :

a) Hydrolyses enzymatiques

I - L'α-galactosidase du Café, à pH 5, après 2 jours à 37°, détache du corps A le galactose, en donnant un trisaccharide de R_f = 0,17 migrant un peu plus vite que le raffinose de R_f = 0,15 sur papier Whatman n°1 avec le solvant I (p. 23). Il reste une tache du corps A non attaqué même après plusieurs jours d'hydrolyse.

2 - L'enzyme de Penicillium Paxillus, à pH 5, après 24 heures d'incubation à 37°C, hydrolyse totalement le corps A en galactose, glucose et fructose.

b) Détermination du rapport moléculaire :

Galactose/glucose/fructose du corps A après hydrolyse .

Sur un échantillon de cet holoside, nous avons déterminé le rapport moléculaire de ces trois oses. Cette détermination fut effectuée selon le protocole suivant : 20 mg de sucre préalablement desséché jusqu'à poids constant, sont dissous dans 1,75 ml d'eau distillée, nous ajoutons 0,25 ml de tampon acide citrique-phosphate disodique de pH 5,2 : 0,5 ml de préparation enzymatique de Penicillium Paxillus, et maintenons à 37°. Après 24 heures la chromatographie sur papier indique une hydrolyse complète de l'holoside.

L'hydrolysat est alors soumis à une chromatographie descendante sur papier Schleicher et Schüll 2043 bM selon la technique suivante : nous découpons nos papiers en bandes rectangulaires de

46 cm de longueur et de 24 cm de largeur. Parallèlement au côté supérieur de la bande de papier nous traçons au crayon une ligne droite dite ligne de départ et nous indiquons au crayon les emplacements sur lesquels seront disposées les gouttes, deux emplacements extrêmes à 3 cm des bords de la feuille et cinq emplacements intermédiaires à 3 cm l'un de l'autre.

A l'aide d'une micropipette à electrophorèse délivrant 0,01 ml, nous déposons à chacun des emplacements 0,04 ml d'hydrolysat enzymatique.

Le développement du chromatogramme est réalisé avec le solvant I à 18°, pendant 48 heures. Après séchage du chromatogramme, nous découpons longitudinalement à droite et à gauche de celui-ci deux bandes de papier, et par une révélation au réactif à la β-naphtylamine, nous repérons sur chacune des bandes les glucides du milieu hydrolysé, et nous déterminons les places des oses de l'hydrolysat sur la partie du chromatogramme non révélée. Nous découpons des bandes correspondant à chacun des oses, et provenant d'un seul spot du chromatogramme et nous les éluons par l'eau distillée à la température du laboratoire, selon une technique identique à celle de LAIDLAW et REID (81).

Les sucres élués sont dosés par la méthode de SOMOGYI-NELSON (p.17). Les resultats des dosages sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau

Détermination du rapport moléculaire Gal/Glu/Fru du corps A

Spot du chromatogramme	Quantités trouvées (en µg)			Rapport moléculaire
	Gal	Glu	Fru	
n° I	86	87	170	I / 1,01 / 1,98
n° 2	83	85	171	1 / 1,02 / 2,06
n° 3	84	86	169	1 / 1,02 / 2,01
n° 4	84	85	170	1// 1,01 / 2,02
n° 5	86	88	171	1 / 1,04 / 1,98

Il en résulte que le corps A est un tétrasaccharide, ayant un rapport moléculaire galactose/glucose/fructose égal à 1/1/2

c) Pouvoir rotatoire du corps A

Nous avons déterminé le pouvoir rotatoire d'un échantillon du corps A, après dessiccation sous vide phosphorique pendant une semaine.

$$|\alpha|_D^{20°} = + 63°,4 \quad \text{(dans l'eau)}$$

(A = 2°,2 ℓ = 1 c = 3,47)

d) Méthylation puis hydrolyse

I - METHYLATION

Nous avons employé la méthode préconisée par KUHN et BROSSMER (80). Dans un flacon coloré, nous introduisons : 40 mg du produit A, 8 ml de diméthylformamide, 2 ml d'iodure de méthyle.

Après 20 minutes d'agitation, nous ajoutons dans ce mélange préalablement refroidi à 0° , 3 g d'oxyde d'argent préparé extemporanément.

Le milieu réactionnel est ensuite agité 12 heures à 4°, puis 24 heures à la température du laboratoire.

Le précipité est éliminé par filtration, lavé avec 2 ml de diméthylformamide, puis 3 fois avec 4 ml de chloroforme. Le filtrat est ensuite mélangé avec 60 ml de chloroforme, et laissé à la glacière pendant une heure. Il se forme un précipité que nous enlevons par filtration. Nous éliminons ensuite l'excès d'argent par agitation avec une solution à 0,5 p.100 de cyanure de potassium.

La solution chloroformique est ensuite lavée 2 fois avec de l'eau, puis distillée sous vide à 0°.

Le résidu obtenu, partiellement méthylé, est dissous dans 8 ml de diméthylformamide et agité pendant 8 heures à 0° et 8 heures à la température du laboratoire, avec 0,8 g d'oxyde de baryum et 2 ml d'iodure de méthyle dans un récipient relié à un tube contenant $Ca\,C\ell_2$. Ce mélange est ensuite filtré et le précipité lavé par le diméthylformamide. Nous ajoutons dans le filtrat 10 ml de $CH\,C\ell_3$, et nous lavons la solution obtenue à trois reprises avec chaque fois 20 ml d'eau distillée. Cette solution est desséchée par le sulfate de sodium, et évaporée sous vide à 50° jusqu'à siccité.

2 - HYDROLYSE DU CORPS METHYLE

Le saccharide complètement méthylé est hydrolysé pendant 8 heures au B.M. bouillant par l'acide sulfurique 0,5 N dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. Après refroidissement, nous neutralisons le milieu par le carbonate de strontium, centrifugeons, et évaporons à sec le surnageant. Le résidu est repris par le chloroforme, agité avec 30 mg de charbon activé, et filtré. Cette solution chloroformique est utilisée pour l'étude chromatographique.

3 - CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES METHYLES

Cette chromatographie est réalisée parallèlement avec un mélange témoin formé d'hexoses méthylés provenant de la méthylation du stachyose et du plantéose.

La préparation du stachyose est relatée dans la première partie, chapitre II, et le plantéose est obtenu selon la technique HERISSEY (71). Nous avons méthyle un mélange formé de 50 mg de stachyose et 50 mg de plantéose selon la technique décrite plus haut pour le corps A. Les hexoses méthylés dans le mélange témoin sont les suivants :

Hexoses méthylés provenant du stachyose

α Galp (1 $\rightarrow$ 6) α Galp (1 $\rightarrow$ 6) α Glup (1 $\rightarrow \leftarrow$ 2) Fruf

tétraméthyl 2-3-4-6 galactose
triméthyl 2-3-4 galactose
triméthyl 2-3-4 glucose
tétraméthyl 1-3-4-6 fructose

Hexoses méthylés provenant du plantéose

α Galp (1 $\rightarrow$ 6) β Fruf (2 $\rightarrow \leftarrow$ 1) α Glup

tétraméthyl 2-3-4-6 galactose
tétraméthyl 2-3-4-6 glucose
triméthyl 1-3-4 fructose

Nous déterminons les mobilités R_G par rapport au tétraméthyl 2-3-4-6- glucose (R_G = 1). Nous révélons : les dérivés méthylés du fructose par une solution alcoolique d'oxalate d'urée (révélateur n°IV p. 23) et les dérivés méthylés du glucose et du galactose par une solution alcoolique d'oxalate d'aniline (révélateur n°III p. 23).

Aucun dérivé diméthylé d'hexose n'a été décelé, ce qui montre que, dans nos conditions opératoires, la méthylation a été complète.

a) avec le solvant n°IV, sur papier Whatman n°I, après 13 heures de développement, nous obtenons avec le mélange témoin une tache de R_G = 0,83 correspondant au triméthyl 1-3-4 fructose et une autre tache de R_G = 1,01 provenant du tétraméthyl 1-3-4-6 fructose. Avec les produits méthylés du corps A, les taches obtenues ont également des R_G de 0,83 et 1,01.

b) avec le solvant n°V, sur papier Whatman n°I, après 16 heures de développement à 18°, nous obtenons trois corps. Les mélanges du témoin et de l'essai donnent les taches suivantes :

triméthyl 2-3-4- galactose $R_G = 0,21$
triméthyl 2-3-4- glucose $R_G = 0,58$
triméthyl 1-3-4- fructose $R_G = 0,84$
tétraméthyl 2-3-4-6- galactose $R_G = 0,94$
tétraméthyl 1-3-4-6- fructose $R_G = 1,12$

DISCUSSION

I°- Le corps A migre sur les chromatogrammes moins vite que le raffinose et plus vite que le stachyose. Nous sommes en présence soit d'un tétraholoside, soit d'un triholoside. Le rapport moléculaire : galactose/glucose/fructose égal à 1/1/2 montre qu'il s'agit d'un tétrasaccharide. La présence de deux molécules de fructose dans le corps A explique sa mobilité chromatographique plus grande que celle du stachyose : un holoside dont le fructose est remplacé soit par un glucose, soit par un galactose a une vitesse de migration plus petite que celui du corps initial.

Le corps A paraît être formé par action transférante de l'invertase de levure : ceci explique la présence dans ce composé d'une molécule de fructose de plus que dans le raffinose. L'enzyme peut employer une molécule de raffinose comme donateur de radical fructosyl et une autre molécule de raffinose comme accepteur. Le mécanisme d'action de la fructosidase, comme celui des osidases transférantes, est déjà bien connu par suite de nombreux travaux déjà mentionnés (13) (49) (53).

Nous pouvons expliquer la formation du corps A de la façon suivante :

a/ Dans un premier stade, l'invertase EH agit sur le raffinose, que l'on peut considérer comme mélibiosyl-O-fructosyl pour

former un complexe invertase-fructosyl, en libérant le mélibiose :

$$EH + Raffinose \rightleftharpoons E\text{-}Fructosyl + Mélibiose \quad (I)$$

b/ Le complexe invertase-fructosyl, en présence d'une seconde molécule de raffinose, donne par transfert un fructosido-raffinose en libérant l'enzyme :

$$E\text{-}fructosyl + Raffinose \rightarrow EH + fructosido\text{-}raffinose \quad (II)$$

En milieu aqueux, cette réaction est accompagnée d'une hydrolyse qui peut être considérée comme le transfert sur eau :

$$E\text{-}fructosyl + HOH \rightarrow EH + fructose \quad (III)$$

Le corps A est probablement un fructosido-raffinose, tétraholoside formé par transfert du radical fructosyl sur raffinose. Ce transfert est optimum pour une concentration en raffinose suffisamment élevée dans le milieu (10 à 15 p.100 dans les expériences de BEALING (14) et 30 p.100 dans nos essais) mais pas trop forte cependant pour provoquer une action inhibitrice sur l'invertase.

En plus de ces réactions principales il peut se produire des réactions secondaires de transfert : le mélibiose et le fructose libérés dans le milieu par les réactions (I) et (III) pourraient servir d'accepteurs.

Le mélibiose réducteur donne probablement un fructosido-mélibiose qui est lui-même réducteur et que nous avons mentionné plus haut en tant que corps B.

Le fructose accepteur donne naissance au fructobiose réducteur qui se déplace plus vite que le saccharose, sucre que nous n'avons pas pu isoler.

D'ailleurs, ces réactions secondaires ne devraient pas être importantes. En effet, les concentrations en mélibiose ou fructose libérés, nettement inférieures à celle du raffinose, ne sont pas des concentrations optima en accepteurs.

Avec une durée de réaction plus longue, l'enzyme est susceptible d'hydrolyser les fructosides formés par transfert, ce qui jus-

tifie les conditions opératoires employées pour l'obtention du corps A.

2°- Il nous reste à préciser les points d'attache du radical fructosyl transféré sur raffinose, c'est-à-dire à déterminer la structure probable du corps A.

a/ Ce composé ne peut être un ~~tri~~tétrasaccharide branché. En effet, il nous est impossible de déceler un dérivé diméthylé provenant de la méthylation de ce corps. Ceci était à prévoir, car l'obtention d'un ~~tri~~tétrasaccharide branché ne pourrait avoir lieu que si le radical fructosyl était transféré sur une fonction alcool secondaire du raffinose : or dans la littérature on ne signale que le transfert catalysé par les fructosidases sur les fonctions alcools primaires.

b/ L'existence du tétraméthyl 2-3-4-6 galactose et du triméthyl 1-3-4 fructose nous montre que le radical fructosyl est transféré sur la fonction alcool primaire en 6 du fructose du raffinose.

De même, l'existence du triméthyl 2-3-4 galactose ne peut être expliqué qu'en admettant que le transfert s'effectue sur la fonction alcool primaire en 6 du galactose du raffinose.

De plus, l'obtention de cinq dérivés méthylés d'hexoses par la méthylation nous amène à penser que le corps A se comporte comme s'il s'agissait d'un mélange des deux composés suivants :

AI = Galp (1 → 6) Glup (1 ⇄ 2) Fruf (6 ← 2) Fructofuranoside
A2 = Fruf (2 → 6) Galp (1 → 6) Glup (1 ⇄ 2) Fructofuranoside

Ces formules sont justifiées par les faits suivants :

Les corps AI et A2 ne sont pas réducteurs. Il en résulte que le corps A formé du mélange de AI et A2 n'est pas non plus réducteur.

Le triméthyl 1-3-4 fructose et le tétraméthyl 2-3-4-6 galactose proviennent du corps AI, le triméthyl 2-3-4 galactose provient du corps A2, le triméthyl 2-3-4 glucose et le tétraméthyl 1-3-4-6 fructose proviennent des deux corps AI et A2 : ce sont précisément

les cinq dérivés méthylés d'hexoses obtenus à partir du corps A et identifiés plus haut.

L'intensité de la tache du triméthyl 2-3-4 galactose, comparée à celle du tétraméthyl 2-3-4-6 galactose nous montre que le corps A_2 est obtenu en quantité bien moins importante que le corps A_1 (environ 20 p.100).

Les deux corps A1 et A2 ne sont pas séparables avec nos conditions de chromatographie, et ne sont identifiés comme deux isomères distincts que par la méthylation. Des résultats analogues ont été signalés par GROSS, BLANCHARD et BELL dans le cas du transfert sur saccharose par l'invertase des moisissures. Le néokestose (O-β-D- fruf (2 $\rightarrow$6) α glup (1 $\rightarrow$ $\leftarrow$ 2) β fruf formé par transfert est souillé de 10 % de I-kestose (O-α-Glup (1$\rightarrow$ $\leftarrow$2) β fruf (1 $\rightarrow$2) fruf) qui est lui-même formé par transfert (64).

c/ L'α-galactosidase du Café ne peut détacher que le galactose terminal lié en 6 des galactosides, d'après les travaux de COURTOIS et Coll. (28) (38). Quand nous soumettons le corps A à l'action de cet enzyme, le corps A2 ne subit aucune hydrolyse (ce qui justifie une tache de même Rf que le corps initial), tandis que le corps AI est hydrolysé en galactose et en un saccharide migrant plus vite que le raffinose. Il s'agit probablement du 6-kestose ou fructosido-6-F-saccharose. Ce trisaccharide est signalé dans des Graminées : Lolium perenne par SCHLUBACH, LUBBERS et BOROWSKI (98) ; Lolium multiflorum et Arrhenatherum elatius par BACON (12).

d/ Nous avons déterminé le pouvoir rotatoire du corps A. Ce pouvoir rotatoire, en solution aqueuse égal à + 63°,4 est nettement inférieur à ceux du raffinose, (α)D = + 105°) et du stachyose (α)D = + 148°). Comme il s'agit d'un mélange, il est difficile de tirer une conclusion sur les pouvoirs rotatoires de leurs composants, c'est-à-dire du corps AI et du corps A2.

CONCLUSION

La fructosidase de levure est susceptible de transférer le radical fructosyl sur deux des trois fonctions alcool primaire du raffinose. Nous avons pu isoler et identifier le mélange formé des deux tétrasaccharides suivants :

A I = Galp (1 → 6) Glup (1 → ← 2) Fruf (6 ← 2) Fruf

A 2 = Fruf (2 → 6) Galp (1 → 6) Glup (1 → 2) Fruf

Il est probable que la troisième fonction alcool primaire du raffinose peut servir aussi d'accepteur du radical fructosyl. Mais le fructosido-raffinose qui prendrait naissance dans cette réaction serait en quantité minime non décelable dans nos conditions opératoires.

-:-

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

-:-

A) Nous avons étudié les tréhalases d'origines très différentes :

a) celle de levures hautes (Springer)

b) celle des graines de Plantago ovata

c) celle du Hanneton Melolontha vulgaris (insecte mature)

La tréhalase du Hanneton a été notablement purifiée par chromatographe sur colonne d'alumine.

1°- La tréhalase de levure présente deux pH optima : l'un à 4,13, l'autre plus saillant à 5,35. La courbe d'activité, en fonction du pH, de l'enzyme des graines de Plantain, très aplatie, possède un optimum vers pH = 6,5. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus par divers auteurs : les tréhalases, comme la plupart des osidases, présentent des pH optima tous situés dans la zone acide.

2°- Ces tréhalases possèdent de faibles constantes de Michaelis. Les K_m pour les enzymes de levure, de graines de Plantain et du Hanneton ont respectivement pour valeurs : 9.10^{-4} M, 3.10^{-4} M et 7.10^{-4} M. Les combinaisons tréhalose-tréhalase sont en moyenne dix fois moins dissociées que les combinaisons oside-osidase formées par les principales glucidases. Nous pouvons en conclure que la tréhalase a une très forte affinité pour le tréhalose, affinité nettement supérieure à celles que manifestent la plupart des autres osidases vis-à-vis de leurs substrats.

3°- Nous avons effectué des essais de transfert avec ces trois enzymes. En employant le tréhalose comme donateur, et divers composés hydroxylés : alcools acycliques, hexoses, pentose comme accepteurs possibles, nous n'avons obtenu aucun transfert. Ces ré-

sultats négatifs ne sauraient tenir à l'utilisation d'accepteurs qui ne sont pas actifs. En effet, avec une tréhalase partiellement purifiée de Hanneton, aucun transfert n'a pu être décelé en employant le saccharose comme accepteur, pourtant ce disaccharide a été signalé comme un accepteur sélectif, pour d'autres osidases telles que α-galactosidases, β-galactosidases, β-fructofuranosidase etc...

B) Nous avons essayé d'interpréter l'absence d'activité transférante de la tréhalase par les hypothèses suivantes :

1°- Structure symétrique de la molécule de tréhalose. Nos essais confirment les conceptions de DAHLQVIST, selon lesquelles la tréhalase a une façon plus symétrique d'attaquer son substrat que ne l'ont les autres osidases. Ces dernières agissent généralement sur leur substrat d'une façon asymétrique, en ce sens qu'elles sont plus fortement liées à la partie glycone de leurs substrats qu'à la partie aglycone. Les résultats négatifs dans les essais de transfert avec la phytase signalés par ANAGNOSTOPOULOS et LINO viennent appuyer cette hypothèse : l'absence de propriété transférante pourraient être due à la symétrie du donateur : tréhalose dans le cas de la tréhalase, acide phytique dans le cas de la phytase.

2°- Configuration particulière du groupe actif de la tréhalase. La faible dissociation de la combinaison tréhalose-tréhalase provient probablement de la structure particulière du groupe actif de l'enzyme. Celui-ci se comporte comme s'il avait un caractère hydrophile orientant le clivage du lien osidique vers une réaction d'hydrolyse.

3°- L'inaptitude de la trehalase à transférer un groupement α-D-glucopyranosyl la différencie nettement des autres osidases réalisant des réactions de transosylation à partir d'oligosaccharides donateurs. Cette inaptitude ne correspond pas à une insuffisance d'énergie de la liaison osidique du tréhalose.

C) Nous avons étudié plus particulièrement la préparation enzymatique du Hanneton. Cette préparation renferme un éventail assez

large d'osidases agissant sur divers oligosaccharides, hétérosides et polysaccharides : α-et β-glucosidases, galactosidases, mannosidases, amylase, hémicellulase etc... nous avons comparé l'équipement enzymatique du Hanneton à celui des insectes xylophages étudiées par COURTOIS, CHARARAS et DEBRIS. Nous n'avons pas noté de fortes différences dans l'intensité de l'action sur les oligosaccharides et les hétérosides, par contre les insectes xylophages ont une action plus efficace que le Hanneton sur les polysaccharides des parois cellulaires comme les araboxylanes, hémicelluloses et pectines.

D) Nous avons étudié l'action transférante de l'invertase de levure sur le raffinose agissant à la fois comme donateur et accepteur du groupement fructofuranosyl. Nous avons pu séparer les saccharides formés par le transfert de Rf inférieurs à celui du Raffinose.

L'un de ces corps est constitué par un mélange de deux tétra-saccharides isomères contenant une molécule de glucose, une de galactose et deux de fructose.

L'étude de l'action des enzymes et l'identification des oses méthylés obtenus après méthylation suivie d'hydrolyse permet de considérer comme très probables les structures suivantes des deux monofructosides du raffinose :

I°- O-β-fructofuranosyl (2 → 6) O α-galactopyranosyl (1 → 6) O α-glucopyranosyl (1 → ← 2) O β-fructofuranoside

2°- O α-galactopyranosyl (1 → 6) O α-glucopyranosyl (1 → 2) O β-fructomanosyl (6 ← 2) O β-fructofuranoside.

-:-

BIBLIOGRAPHIE

-:-

1 - ALBON (N.), BELL (D.J.), BLANCHARD (P.H.), GROSS (D.) et RUNDELL (J.T.)
J. Chem. Soc. 1953, 24

2 - ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1115

3 - ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)
Arch. Sci. Biol. 1955, 39, 631

4 - ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et SERVANT (J.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1581

5 - ANAGNOSTOPOULOS (C.) et LINO (A.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 781

6 - ANAGNOSTOPOULOS (C.) et LINO (A.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 1045

7 - ARNAUD (M.)
Th. Doct. Etat Pharm., Paris 1958

8 - BABA (T.)
Biochem. Z. 1934, 273, 207

9 - BACON (J.S.D.) et EDELMAN (J.)
Arch. Biochem. Biophys. 1950, 28, 467

10 - BACON (J.S.D.)
Biochem. Jl. 1952, 50, XVIII

11 - BACON (J.S.D.)
Biochem. Jl. 1954, 57, 320

12 - BACON (J.S.D.)
Biochem. Jl. 1959, 73, 507

13 - BACON (J.S.D.)
The oligofructosides. Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1441-1449

14 - BEALING (F.J.)
Biochem. J. 1953, 55, 94

15 - BELL (D.J.) et EDELMAN (J.)
J. Chem. Soc. 1954, 4652

16 - BERTHELOT (M.)
Ann. Chim. phys. 1859, 55, 269

17 - BLANCHARD (P.H.) et ALBON (N.)
Arch. Biochem. Biophys. 1950, 29, 220

18 - BOURQUELOT (E.)
C.R. Ac. Sc. 1893, 116, 826

19 - BOURQUELOT (E.)
Bull. Soc. Myco. France, 1893, 9, 189

20 - BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
C.R. Ac. Sc. 1904, 139, 874

21 - BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
Bull. Soc. Myco. France, 1905, 21, 50

22 - CABIB (E.) et LELOIR (L.F.)
J. Biol. Chem. 1958, 231, 259

23 - CANDY (D.J.) et KILBY (B.A.)
Biochem. Jl. 1961, 78, 531

24 - COURTOIS (J.)
Th. Doct. Sc. Phys. Paris 1938

25 - COURTOIS (J.E.)
Les oligosaccharides non réducteurs contenant du galactose in WOLFROM, (M.L.) carbohydrate chemistry of substances of biological interest. Pergamon Press, Londres 1959, p.140-159

26 - COURTOIS (J.E.)

Quelques aspects du métabolisme du galactose chez les animaux et les végétaux - in PONZ (F.) et VILLAR-PALASI (V.) Proceedings of the Fifth Latin International Biochemical Meeting. Vol.I. Chemistry and Metabolism of the Carbohydrates, Barcelona 1960, p.121-179

27 - COURTOIS (J.E.)

Les galactosides du saccharose. Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1451-1466

28 - COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 731

29 - COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 1277

30 - COURTOIS (J.E.), CARRERE (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 1251

31 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 1189

32 - COURTOIS (J.E.) et LECLERC (M.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 365

33 - COURTOIS (J.E.) et LINO (A.)

Les phosphatases des végétaux supérieurs, répartition et action - in ZECHMEISTER (L.), Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles, 1961, 19, p.316-373

34 - COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 715

35 - COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et TO DONG

Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 1189

36 - COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et TO DONG

C.R. Soc. Biol. 1961, 160, 1462 et Bull. Soc. Chim. Biol. 1962, 44, à l'impression

37 - COURTOIS (J.E.) et POISSON (J.)
Semaine des Hôpitaux. Path. Biol. 1960, 8, 825

38 - COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et le DIZET (P.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 851

39 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1958, 12, 2012

40 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1959, 13, 1816

41 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1960, 14, 1

42 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1960, 14, 9

43 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1960, 14, 63

44 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand. 1960, 14, 1797

45 - DAHLQVIST (A.)
Biochem. Jl. 1961, 78, 282

46 - DAHLQVIST (A.) et BORGSTRÖM (B.)
Acta Chem. Scand. 1959, 13, 1659

47 - DEBRIS (M.M.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1962, 44, à l'impression

48 - DEDONDER (R.)
Proceedings of the Fifth Latin International Congress of Biochemistry Meeting. Rev. espan. fisiol. Suppl. 1959, 1, 183

49 - DEDONDER (R.A.)
Glycosidases and transglycosidation. Ann. Rev. Biochem. 1961, 30, p.347-382

50 - DIMROTH (O.) et SCHWEITZER (R.)
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1923, 56, 1375

51 - DUCHATEAU (G.) et FLORKIN (M.)
Arch. Inter. Physiol. Biochem. 1959, 67, 306

52 - EDELMAN (J.)
Biochem. Jl. 1954, 57, 22

53 - EDELMAN (J.)
Transfructosylation in plants, and especially in Helianthus tuberosus L. Bull.Soc.Chim.Biol.1960, 42, p.1737-1744

54 - FEINGOLD (D.S.)
Discussion des rapports de J. EDELMAN et R. DEDONDER.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 42, 1762

55 - FEINGOLD (D.S.), AVIGAD (G.) et HESTRIN (S.)
Biochem. Jl. 1956, 64, 351

56 - FISCHER (E.)
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1895, 28, 1429

57 - FISCHER (E.) et NIEBEL (W.)
Sitzber. kgl. pseuss. Akad. Wiss. 1896, p.73
Chem. Centr. 1896, 1, 499

58 - FLEURY (P.) et COURTOIS (J.)
Enzymologia, 1937, 1, 377

59 - FLEURY (P.) et COURTOIS (J.)
Biochim. Biophys. Acta 1947, 3, 256

60 - FRIEDMAN (S.)
Arch. Biochem. Biophys. 1960, 87, 252

61 - FREREJACQUE (M.)
C.R. Ac. Sc. 1941, 213, 88

62 - GHIONE (M.), MINGHETTI (A.) et SANFILIPPO (A.)
Giorn. microbiol. 1959, 7, 94

63 - GOTTSCHALK (A.), in SUMNER (J.B.) et MYRBACK (K.)
The Enzymes in Academic Press
New-York I950, p. 580-582

64 - GROSS (D.), BLANCHARD (P.H.) et BELL (D.J.)
J. Chem. Soc. 1954, 1727

65 - HALLIWELL (G.)
Biochem. Jl. 1961, 79, 185

66 - HEHRE (E.J.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1713

67 - HELFERICH (B.)
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1944, 77, 194

68 - HELFERICH (B.) et SCHMITZ-HILLEBRECHT
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1933, 66, 378

69 - HELFERICH (B.) et V. STRYK (F.)
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1941, 74, 1794

70 - HELLER (J.)
Symposiums of the Fifth International Congress of Biochemistry. Moscow August 1961, à l'impression.

71 - HERISSEY (H.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 1553

72 - HOWDEN (G.F.) et KILBY (B.A.)
Chem. and Ind. 1956, 1453

73 - ILVAINE (M.)
J. Biol. Chem. 1921, 49, 183

74 - IWANOFF (N.N.)
Biochem. Z. 1925, 162, 455

75 - JERMYN (M.A.) et ISHERWOOD (F.A.)
Biochem. Jl. 1949, 44, 402

76 - KALANTHAR (A.)
Z. physiol. Chem. 1898, 26, 88

77 - KALCKAR (H.M.) in Mc ELROY (W.D.) et GLASS, (B.).
The mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954, p.675

78 - KALF (G.F.) et RIEDER (S.V.)
J. Biol. Chem. 1958, 230, 691

79 - KOIKE (H.)
Soil. Mag. Tokyo. 1954, 63, 228

80 - KUHN (R.) et BROSSMER (R.)
Ber. Dtsch. Chem. Gesell. 1959, 92, 1667

81 - LAIDLAW (R.A.) et REID (S.G.)
Nature (G.B.) 1950, 166, 476

82 - LARNER (J.) in BOYER (P.D.), LARDY (H.) et MYRBACK (K.)
The enzymes. 2nd edition Academic Press. New York
1960, vol. 4 p. 369

83 - LEIBOWITZ (J.) et HESTRIN (S.)
Nature (G.B.) 1949, 143, 333

84 - LINDNER (P.)
Wochschr. Brau 1911, 28, 61 Chem. Centr. 1911, 1 ,831

85 - LINEWEAVER (H.) et BURK (D.)
J. Amer. Chem. Soc. 1934, 56, 658

86 - MANNERS (D.J.)
Trans α -and β -glucosylation reactions.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 42, p.1789-1798

87 - MYRBÄCK (K.)
Trehalose und Trehalase.
Ergeb. Enzymforsch. 1949, 10, p.168-190

88 - NELSON (N.)
J. Biol. Chem. 1944, 153, 375

89 - PAZUR (J.H.), MARSH (J.M.) et TIPTON (C.L.)
J. Amer. Chem. Soc. 1958, 80, 1433

90 - PEAT (S.), WHELAN (W.J.) et HINSON (K.A.)
Nature (G.B.) 1952, 170, 1056

91 - PEAT (S.), WHELAN (W.J.), et HINSON (K.A.)
Chem. and Ind. 1955, 385

92 - PETEK (F.) et TO DONG
Enzymologia, 1961, 23, 133

93 - ROUDIER (A.)
Th. Paris 1954 et Memor. Serv.Chim.Etat, 1954, 39, 149

94 - ROUDIER (A.)
Chim. et Ind. 1958, 79, 173

95 - ROUDIER (A.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1493

96 - SAITO (S.)
J. Biochem. (Japan) 1960, 48, 101

97 - SATINA (S.) et BLAKESLEE(A.F.)
Proc. Natl. Ac. Sc. U.S. 1928, 14, 229

98 - SCHLUBACH (H.H.), LÜBBERS (H.) et BCROWSKI (H.)
Liebigs Ann. 1955, 595, 229

99 - SOMOGYI (M.)
J. Biol. Chem. 1945, 160, 69

100- SUMNER (J.B.) et SOMERS (J.B.)
Laboratory experiments in biological chemistry.
Academic Press, New York 1949 p.132

101- TAKANO (K.)
Sc. Reports of Tokyo Kyoiku Daigaku 1960, 9, 155

102- TANRET (M.G.)
C.R. Ac.Sc. 1931, 192, 1056

103- TO DONG
Recherches non publiées, feront l'objet d'une Th.Doct.
Etat Pharm. Paris 1962

104 - WALLENFELS (K.)
Transgalaktosylierung. Bull. Soc.Chim. Biol. 1961, 42 p. 1715-1729

105 - WEIDENHAGEN (R.)
Ergeb. Enzymforsch, 1932, 1, 168

106 - WHELAN (W.J.) et JONES (D.M.)
Biochem. Jl. 1953, 54, XXXIV

107 - WHITAKER (D.R.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1701

108 - WHITE (L.M.) et SECOR (G.E.)
Arch. Biochem. Biophys. 1952, 36, 490

109 - WIGGERS (H.A.L.)
Ann. 1832, 1, 129

110 - WILLSTADT (H.) et BORGGARD (M.)
Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 1946, 23, n°3, B1

111 - WYATT (G.R.) et KALF (G.F.)
Fed. Proc. 1956, 15, 388

112 - WYATT (G.R.) et KALF (G.F.)
J. gen. Physiol. 1957, 40, 833

113 - ZEBE (E.C.) et Mc SHAN (W.H.)
J. Cell. Comp. Physiol. 1959, 53, 21

-:-

TABLE DES MATIERES

-:-

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

Chapitre I - Généralités sur la tréhalase 6

1 - Historique 6
2 - Répartition 8
3 - Spécificité et propriétés 10

Chapitre II - Matériel et techniques 12

A - Préparation des substrats

1 - Préparation de l'α -phényl-galactoside 12
2 - Préparation du β -phényl-galactoside 14
3 - Phényl-glucosides α et β , phényl-mannosides α et β 14
4 - Préparation du stachyose 14
5 - Préparation du tréhalose 16

B - Dosage des sucres réducteurs

1 - Réactifs 17
2 - Dosage 18

C - Chromatographie sur papier

1 - Papiers chromatographiques 19
2 - Matériel utilisé 19
3 - Technique chromatographique 21
4 - Solvants utilisés 23
5 - Réactions de révélation 23
6 - Technique de révélation 25

Chapitre III - Etude des tréhalases de levure et de graines de Plantain 27

A - Etude de la tréhalase des levures

Pages

1 - Préparation de la tréhalase des levures 27
2 - Activité hydrolysante en fonction du pH 28
3 - Détermination de la constante de Michaelis 29
4 - Essais de transfert 31
5 - Discussion 33

B - Etude du tréhalose des graines de PLANTAGO OVATA 33

1 - Répartition de la tréhalase des graines de Plantago Ovata 33
2 - Activité hydrolysante en fonction du pH 34
3 - Détermination de la constante de Michaelis 36
4 - Discussion 38

Chapitre IV - Etude de la tréhalase du Hanneton 39

1 - Préparation de la tréhalase du Hanneton 39
2 - Activité hydrolysante en fonction du pH 39
3 - Détermination de la constante de Michaelis 40
4 - Etude de l'activité transférante de la tréhalase du Hanneton 43
5 - Purification de la tréhalase du Hanneton par la méthode de KALF et RIEDER 44
6 - Chromatographie des osidases du Hanneton sur colonne d'alumine 46
7 - Essai de transfert sur saccharose 48

Chapitre V - Discussion des résultats obtenus avec les tréhalases 49

1 - pH optimum 49
2 - Constante de Michaelis 51
3 - Activité transférante 54
4 - Essais d'interprétation de l'absence d'action transférante de la tréhalase 57
5 - Energie incluse dans la liaison osidique 57
6 - Structure symétrique de la molécule 62
7 - Hypothèse sur la configuration du groupe actif de la tréhalase 66

Chapitre VI - Etude des glucidoses du Hanneton 69

1 - Introduction 69
2 - Matériel et Techniques 70
3 - Hydrolyse de divers oligosaccharides et hétérosides par l'enzyme du Hanneton 71
4 - Action de la préparation enzymatique du Hanneton sur divers polysaccharides 81

Pages

5 - Discussion générale des résultats 87

DEUXIEME PARTIE .....

Action transférante de l'invertase sur raffinose

Introduction 89

Matériel et Techniques 92

1 - Préparation des enzymes 92
2 - Synthèse par transfert enzymatique des fructosides du raffinose 93
3 - Isolement des fructosides formés par transfert ... 94
4 - Identification des fructosides formés par transfert 94

Discussion des résultats 100

Conclusion 104

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 105

BIBLIOGRAPHIE 108

-:-